

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología



**CARACTERIZACION DEL TEJIDO ADIPOSO
PERIVASCULAR Y SU PAPEL EN LA REGULACION DE
LA FUNCION ARTERIAL EN RATAS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
Beatriz Gálvez Prieto

Bajo la dirección de la doctora:
Soledad Fernández Alfonso

Madrid, 2007

- **ISBN: 978-84-669-3031-4**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR Y SU PAPEL EN LA
REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN ARTERIAL EN
RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ GÁLVEZ PRIETO

MADRID, 2007

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO
PERIVASCULAR Y SU PAPEL EN LA
REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN ARTERIAL EN
RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

TESIS DOCTORAL

Memoria que presenta

Beatriz Gálvez Prieto

Para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Directora:

M^a Soledad Fernández Alfonso

Madrid, 2007



Departamento De Farmacología
Facultad De Farmacia
Universidad Complutense De Madrid

Dña. MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ ALFONSO, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que Dña. **BEATRIZ GÁLVEZ PRIETO** ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Caracterización del tejido adiposo perivascular y su papel en la regulación de la función arterial en ratas espontáneamente hipertensas” con objeto de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste a todos los efectos, firmo el presente certificado en Madrid, a 13 de Abril de 2007.

Fdo: M^a Soledad Fernández Alfonso

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de la Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0558/2004) y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-05180) y con una beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense de Madrid.

A mi familia
A Pedro

AGRADECIMIENTOS

Han pasado cuatro años desde que comencé mi tesis doctoral. Durante estos años han ocurrido cosas maravillosas y otras no tanto, que me han ayudado a conocerme y superarme a mi misma. Ha sido, por tanto, una etapa muy enriquecedora tanto en el aspecto profesional como en lo personal. Nada de esto hubiera sido posible, sin la valiosa ayuda de todas las personas que han compartido conmigo estos años de formación.

En el primer lugar, me gustaría dar las gracias a la Universidad Complutense de Madrid por haberme concedido una beca predoctoral y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

Gracias, especialmente a la Dra. M^a Soledad Fernández Alfonso, mi directora de tesis, por aceptarme en su grupo de investigación, por su optimismo, por hacer más fáciles las cosas, por su paciencia, por su confianza en mí, sus ánimos, sus consejos y por su amistad.

También quisiera dar las gracias al Dr. Mariano Ruiz-Gayo por animarme a realizar una tesis doctoral, por su ayuda y valiosos consejos durante estos cuatro años.

Gracias, a la Dra. M^a Carmen González, a la Dra. Silvia Arribas y a la Dra. M^a Victoria Conde por su inmensa ayuda en los experimentos de reactividad vascular, por sus consejos, por enseñarme tantas cosas y por su entera disposición.

Gracias, al Departamento de Farmacología por aceptarme en el mismo y permitirme realizar en él mi tesis doctoral. A la gente del departamento en general Paloma, Sagrario, Rosa, Carla, Beatriz... por vuestra amabilidad y ayuda. Pero especialmente a Jorge, José Antonio, Luis Miguel, Paqui, Carmén, Mavi, Cristina, Natalia, con los que he compartido tantos buenos momentos dentro y fuera del departamento.

Gracias, a la Dra. Mercedes Delgado y el Catedrático José Ángel Fuentes por su amabilidad y por prestarme su ayuda siempre que fue necesario.

A todos mis compañeros de la Unidad de Catografía Cerebral del Instituto pluridisciplinar, Ana, Nuria, Eva, José Antonio, Luis, Paqui, Julian, a los que ya se fueron Sheila, M^a Angel, a las chicas de excelencia, Cristina y Ana y al personal del Instituto por aguantar mis agobios, por vuestra ayuda, apoyo, ánimos, consejos y por todas esas conversaciones divertidas. Mil gracias en especial a Paula, Rocio e Ismael por aguantar mi

nerviosismo en estos últimos días, por animarme tantísimo, y demostrarme que puedo contar con vosotros para lo que sea.

Quisiera agradecer al Dr. Reiner Kreutz y a la Dra. Juliane Bolbrinker el haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y haberme ayudado durante mi estancia en Berlín. A todos mis compañeros de Berlín, Judith, Heike, Ibrahim, Marcus, Silke, Angela, Katrin, Amit, Stefi, Noubert, Gabi, Frijogh...por vuestra hospitalidad, por vuestra ayuda y por haberme hecho pasar cinco meses maravillosos en Berlín.

A Fátima gracias por tu amistad, por tus consejos, por tu ayuda y compañía durante tantas horas que hemos pasado juntas con los experimentos de reactividad.

A José María González y a las chicas de Farmacología, del grupo del Dr. Vicente Lahera, por todos los buenos y divertidos momentos pasados en los congresos.

A todo el grupo de Farmacología de la Universidad San Pablo CEU, especialmente a Beatriz Somoza, Beatriz Merino, Rocio, Marta, Marivi, Elisa, Mina, por vuestra disposición e inmensa ayuda con el western blot, por vuestros buenos consejos, por vuestros ánimos, y por tantos momentos agradables y divertidos.

A mis amigos, especialmente Ana, Merce, Estela, Alicia, Alvaro, César, Martín Yayo, José Luis, Alberto y Diego por preocuparse por mi, apoyarme y animarme en todo momento.

Gracias a Pedro por quererme tanto y demostrarmelo sobre todo durante esta última etapa de la tesis, que ha resultado tan dura para mi. No sé cómo expresar lo agradecida que estoy por la paciencia que tienes conmigo, el que me demuestres cada día que estas orgulloso de mi, y el que en los momentos malos hayas confiado en mi más que yo misma y me hayas ayudado a superarlos.

Gracias a Teresa y a Pedro por preocuparos por mi, por esas charlas tan enriquecedoras, por vuestros ánimos y sobre todo por cuidarme tan bien y considerarme una más.

Pero sobre todo y ante todo debo dar las gracias a mi familia, en especial a mi abuela, Eladia, a mis padres, M^a Elena y Cándido, a mis hermanos, M^a Elena y Francisco, y a Manolo por vuestra infinita paciencia al aguantar día tras día mis agobios, mi nerviosismo, mis desalientos, por haber confiado siempre en mí, por estar orgullosos de mí, por vuestra preocupación e incansables ánimos. Sin vosotros no habría conseguido llegar a donde estoy: Gracias simplemente por todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	III
RESUMEN/SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
I. HIPERTENSIÓN ARTERIAL	9
1.1 Tipos de hipertensión	10
II. PATOGENIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL	12
2.1 La rata SHR como modelo animal de hipertensión	14
III. SISTEMA CARDIOVASCULAR E HIPERTENSIÓN ARTERIAL	16
3.1 Estructura de la pared vascular	16
3.2 El endotelio y la regulación del tono vascular	19
3.2.1 <i>Disfunción endotelial</i>	21
3.3 Cambios estructurales en el sistema vascular	23
IV. FACTORES VASODILATADORES DERIVADOS DE ENDOTELIO: NO Y EDHF	25
4.1 Óxido nítrico	25
4.1.1 <i>Biosíntesis del óxido nítrico</i>	26
4.1.2 <i>Dianas del óxido nítrico</i>	27
4.2 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio: EDHF	29
V. CANALES DE POTASIO EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR	30
5.1 Tipos de canales de potasio	31
VI. HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y TEJIDO ADIPOSO VISCERAL	32
6.1 Tipos de tejido adiposo	35
OBJETIVOS GENERALES	43
CAPITULO I: <i>Caracterización del tejido adiposo perivascular y del papel del ADRF en la función vascular de WKY y SHR</i>	45
INTRODUCCIÓN	47
OBJETIVOS CONCRETOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	52
1. Caracterización de los animales de experimentación	52
1.1 Animales de experimentación y obtención de los tejidos adiposos	52

1.2	Parámetros hemodinámicos de las cepas WKY y SHR	52
1.3	Extracción, medida y cuantificación del número de adipocitos del TAM	53
1.4	Determinación del contenido lipídico de los adipocitos mesentéricos	54
1.5	Determinaciones bioquímicas en plasma	54
1.5.1	<i>Determinación de glucosa</i>	54
1.5.2	<i>Determinación de la insulina</i>	55
1.5.3	<i>Determinación de triglicéridos y de glicerol</i>	55
1.5.4	<i>Determinación de ácidos grasos libres</i>	57
1.5.5	<i>Determinación del colesterol total</i>	57
1.6	Determinación de la actividad noradrenérgica en el TAL, de WKY y SHR de 4 y 12 semanas de edad, mediante HPLC	58
2.	Papel del tejido adiposo perivascular en la regulación del tono vascular mesentérico	59
2.1	Obtención del lecho vascular mesentérico de rata	59
2.2	Sistema de perfusión del lecho mesentérico de rata	60
3.	Composición de las diferentes soluciones utilizadas	61
3.1	Composición del Krebs Ringer Bicarbonato	61
3.2	Composición del Krebs-Henseleit modificada	61
3.3	Composición del salino-ascórbico	61
3.4	Fármacos empleados y preparación de los mismos	62
4.	Análisis estadístico	62
	RESULTADOS	63
1.	Caracterización de las ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad	63
1.1	Medidas hemodinámicas	63
1.2	Pesos de los animales y de los tejidos adiposos	63
1.3	Medida y cuantificación de adipocitos mesentéricos	64
1.4	Determinaciones bioquímicas plasmáticas	65
1.5	Determinación de la actividad noradrenérgica en el TAL de WKY y SHR de 12 semanas de edad mediante HPLC	66
2.	Reactividad vascular general del lecho mesentérico de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad	67
2.1	Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico a KCl	67
2.2	Respuesta contráctil a fenilefrina 10^{-5} M	67

2.3 Liberación basal de óxido nítrico	68
2.4 Respuesta relajante dependiente de endotelio. Respuesta a acetilcolina	68
2.5 Efecto de la inhibición de la NOS sobre la respuesta a acetilcolina	69
2.6 Respuesta relajante independiente de endotelio. Respuesta a NPS	69
3. Estudio del efecto anti-contráctil de la grasa perivascular mesentérica de WKY y SHR de 12 semanas de edad	70
3.1 Papel de los canales Kv sobre el efecto anticontráctil del TA perivascular	70
3.2 Relación entre el efecto anticontractil del ADRF y la cantidad de TA perivascular	71
3.3 Efecto de la inhibición de los canales Kv sobre la respuesta del lecho vascular mesentérico a serotonina	71
4. Caracterización de las ratas WKY y SHR de 4 semanas de edad	73
4.1 Medidas hemodinámicas	73
4.2 Pesos de los animales y de los tejidos adiposos	73
4.3 Parámetros bioquímicos plasmáticos	74
4.4 Determinación de la actividad noradrenérgica en el TAL de WKY y SHR de 4 semanas de edad mediante HPLC	74
5. Reactividad vascular general del lecho mesentérico de ratas WKY y SHR de 4 semanas de edad	75
5.1 Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico a KCl	75
5.2 Respuesta contráctil a prostaglandina F _{2α} y serotonina 10 ⁻⁵ M	75
5.3 Respuesta relajante dependiente de endotelio. Respuesta a acetilcolina	76
5.4 Efecto de la inhibición de la NOS sobre la respuesta a acetilcolina	77
5.5 Respuesta relajante independiente de endotelio. Respuesta a NPS	77
6. Estudio del efecto anti-contráctil de la grasa perivascular mesentérica de WKY y SHR de 4 semanas de edad	78
6.1 Efecto de la inhibición de los canales Kv sobre la respuesta del lecho vascular mesentérico a serotonina	78
6.2 Liberación basal de ADRF	79
DISCUSIÓN	80
CAPÍTULO II: Cuantificación de los niveles de leptina del tejido adiposo perivascular y caracterización de su efecto vascular	85
INTRODUCCIÓN	87

I. LEPTINA	87
1.1 Síntesis, liberación y metabolismo de la leptina	88
1.2. Receptores de leptina	90
1.2.1 <i>Internalización del receptor de leptina</i>	91
1.3 Vías de señalización de la leptina	92
1.4 Efectos fisiológicos de la leptina	95
1.4.1 <i>Leptina y función vascular</i>	95
OBJETIVOS CONCRETOS	97
MATERIAL Y MÉTODOS	98
1. Cuantificación de la leptina plasmática y del TAP perivascular (periaortico y mesentérico) en ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad	98
2. Papel de la leptina en la reactividad vascular de la aorta y de la arteria mesentérica superior de WKY y SHR	99
2.1 Extracción de órganos y reactividad vascular	99
2.2 Respuesta vascular de la aorta y de la arteria mesentérica superior a leptina	100
3. Caracterización y cuantificación de los receptores de leptina de la aorta y del lecho vascular mesentérico de estos animales mediante western blot	101
3.1 Preparación de las muestras	101
3.1.1 <i>Determinación de proteínas</i>	102
3.2 Preparación de los geles y electroforesis	102
3.3 Transferencia de las proteínas a un soporte sólido	104
3.4 Bloqueo de los sitios inespecíficos e incubación con el anticuerpo primario	105
3.5 Incubación con el anticuerpo secundario	105
3.6 Revelado	105
3.7 Estudio de la vía de señalización del receptor Ob-Rb a través de la STAT-3 en homogenizados de aorta	106
4. Cuantificación de la expresión génica de leptina en el TAP, TAM y TA por RT- (Taqman) PCR	107
4.1 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN total	109
4.2 Transcripción inversa	111
4.3 Real-Time (TaqMan) PCR cuantitativa	111
5. Composición de las diferentes soluciones utilizadas	114
5.1 Solución empleada para la homogenización de los tejidos	114

5.2 Soluciones empleadas en la técnica de western blot	114
6. Análisis estadístico	114
RESULTADOS	116
1. Niveles plasmáticos de leptina en WKY y SHR de 12 semanas de edad	116
1.1. Correlación entre los niveles plasmáticos de leptina y la cantidad de TAM de WKY y SHR	116
2. Niveles de leptina en el TAP y TAM de WKY y SHR	117
3. Estudio de las diferencias regionales en la expresión génica de leptina dentro de una misma cepa	117
3.1. Estudio de las diferencias de expresión génica de leptina en el TAP, TAM y TAL entre WKY y SHR	118
3.2. Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica de leptina en el tejido adiposo de WKY y SHR	119
4. Efecto de la leptina exógena sobre la función vascular de la aorta y de la arteria mesentérica de WKY y SHR	120
5. Cuantificación de los receptores de leptina: Ob-Rb y Ob-Ra mediante western blot en homogenizados de aorta de WKY y SHR	120
5.1. Detección de las proteínas STAT3 y pSTAT3 en respuesta a la estimulación aguda con leptina	121
DISCUSIÓN	123
CAPITULO III: Caracterización del sistema renina-angiotensina del tejido adiposo perivascular	127
INTRODUCCIÓN	129
I. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)	129
1.1 Acciones de la angiotensina II	132
1.1.1. Acciones sobre la contracción del músculo liso vascular	133
1.1.2 Acciones sobre el crecimiento vascular	133
1.1.3 Acciones sobre el proceso aterogénico	134
II. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA “LOCAL” Ó “TISULAR”	136
2.1 Sistema renina angiotensina del tejido adiposo	136
2.1.1 Angiotensinógeno	136

2.1.2 <i>Renina y receptor de renina</i>	136
2.1.3 <i>ACE, ACE2 y quimasa</i>	137
2.1.4 <i>Receptores de angiotensina</i>	137
2.2 <i>Implicación fisiológica o patofisiológica del SRA adiposo</i>	138
OBJETIVOS CONCRETOS	140
MATERIAL Y MÉTODOS	141
1. Muestras empleadas	141
2. Procedimiento para la RT-(Taqman) PCR	141
3. Isoformas del receptor AT _{1a} , en el TAP, TAM y TAL de WKY y SHR	142
4. Determinación de los niveles de Ang I y Ang II en el TAP, TAM Y TAL de WKY y SHR de 12 semanas de edad por HPLC	143
5. Análisis estadístico	143
RESULTADOS	144
1. Isoformas del receptor AT _{1a} , en el TAP, TAM y TAL de WKY y SHR	144
2. Estudio de las diferencias regionales en la expresión génica de los distintos componentes del SRA dentro de una misma cepa	144
2.1 Angiotensinógeno (AGT)	145
2.2 Renina y Receptor de Renina	145
2.3 Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA, ECA2) y Quimasa	146
2.4 Receptores de Angiotensina II: AT _{1a} , AT ₂	148
3. Comparación del patrón de expresión génica del SRA del TA entre WKY y SHR	149
3.1 Expresión génica del SRA en el TAP	149
3.2 Expresión del SRA en el TAM	151
4. Niveles de Ang I y Ang II en el TAP, TAM Y TAL de WKY y SHR	153
DISCUSIÓN	155
<hr/>	
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFÍA	169
PUBLICACIONES	205

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADRF	Factor relajante derivado de adipocitos
ATP	Adenosin-5´-trifosfato
ADP	Adenosin-5´-difosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
4-AP	4-Aminopiridina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AGT	Angiotensinógeno
BH4	Tetrahidrobiopterina
Ca ²⁺	Ión calcio
COX	Ciclooxigenasa
DOMA	Ácido 3,4-dihidroxi mandélico
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
FC	Frecuencia cardíaca
GC	Gasto cardíaco
GTP	Guanosin trifosfato
GMP _C	Guanosin monofosfato cíclico
GCs	Guani lato ciclasa soluble
HTA	Hipertensión arterial
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
IL-6	Interleucina-6
IP3	Inositol trifosfato
IMC	Índice de masa corporal
JACK- STAT	<i>Janus tyrosine kinase-signal transducer and activator of trasncription</i>

K ⁺	Ión potasio
KBR	Krebs Ringer Bicarbonato
KCl	Cloruro potásico
KH	Krebs-Henseleit modificada
Kv	Canales de potasio dependientes de voltaje
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-ester
MAO	Monoaminoxidasa
NaCl	Cloruro sódico
NA	Noradrenalina
NADPH	Nicotinamida-adenina- dinucleótido fosfato reducido
NO	Óxido nítrico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
NPS	Nitroprusiato sódico
NPY	Neuropéptido Y
Ob-R	Receptor de leptina
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKG	Proteína quinasa dependiente de GMP _C
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PIAS3	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
POMC	Proopiomelanocortina
PTP1B	<i>Protein tyrosine phosphatase 1B</i>
RP	Resistencia vascular periférica
ROS	Radicales libres de oxígeno
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
PDE3B	Fosfodiasterasa 3B
SOCS3	<i>Supresor of cytokine signaling-3</i>

SP	Sustancia P
SRA	Sistema renina-angiotensina
TXA ₂	Tromboxano A ₂
TA	Tejido adiposo
TAP	Tejido adiposo periaórtico
TAM	Tejido adiposo mesentérico
TAL	Tejido adiposo lumbar
TEA	Tetraetilamonio
TK	Tirosina quinasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
t-PA	Activador del plasminógeno tisular
WKY	Wistar Kyoto

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo de esta Tesis ha sido caracterizar el tejido adiposo perivascular (TA) y su papel en la regulación de la función arterial en ratas hipertensas y prehipertensas de la cepa SHR. En relación con este objetivo se ha caracterizado también el efecto vasodilatador de la leptina y se ha cuantificado la expresión génica del sistema renina-angiotensina (SRA) en el TA.

Hemos encontrado que las alteraciones en la cantidad y la función del TA pueden contribuir al incremento de la resistencia vascular periférica. La cepa SHR presenta una menor cantidad de TA mesentérico, adipocitos más pequeños y un menor contenido de lípidos totales y de leptina que la cepa WKY, utilizada como control en este estudio. La menor cantidad de TA facilita la contracción en las arterias mesentéricas, probablemente debido a un menor efecto paracrino del TA perivascular y a una menor liberación de ADRF. A la edad de 4 semanas, la cepa SHR prehipertensa ya presenta una menor cantidad de TA perivascular que la cepa WKY. Esta diferencia no modifica la presión basal de perfusión ni la respuesta contráctil a KCl. Sin embargo, el efecto anti-contráctil de la grasa perivascular en respuesta a vasoconstrictores es ya menor en la cepa SHR prehipertensa. Estos resultados sugieren que las alteraciones en la cantidad y función del TA perivascular son anteriores al establecimiento de la hipertensión y pueden contribuir desarrollo y mantenimiento de la presión arterial elevada en la cepa SHR.

Por otro lado la cepa SHR presenta niveles de leptina plasmáticos y mesentéricos menores que la cepa WKY. Se ha observado una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de leptina y la cantidad de TA blanco. Además, la vasodilatación inducida por leptina en la aorta y en la arteria mesentérica superior es menor en SHR. Esta diferencia no se debe a una menor expresión de la forma larga del receptor Ob-Rb de leptina ni a una menor activación de la vía de señalización intracelular del receptor Ob-Rb. Estos resultados demuestran que la menor cantidad y efecto vasodilatador de la leptina en SHR podrían contribuir al incremento de la presión arterial en esta cepa. Además, el hecho de que la expresión de la forma corta del receptor de leptina (Ob-Ra) sea más baja en la aorta de SHR sugiere un papel a nivel vascular de este receptor.

Además, se ha caracterizado de forma comparativa en SHR y WKY la expresión génica de los componentes del SRA en el TA marrón y blanco perivascular. Hemos detectado que la expresión del SRA es diferente entre los TA analizados y también entre ambas cepas. El hecho más relevante es que la expresión génica de los receptores AT₁ y AT₂, así como la concentración tisular de angiotensina II (AngII), son más elevadas en el TA mesentérico. Además el SRA está regulado a la baja en el TA periaórtico de la cepa SHR. Estos datos sugieren que el SRA del TA perivascular podría tener un efecto paracrino en la regulación del tono vascular. Otro papel del SRA podría ser la regulación autocrina de la cantidad de TA perivascular. De hecho, la Ang II se puede considerar como un factor adipogénico, trófico, implicado localmente en el crecimiento, diferenciación y lipogénesis del TA, así como en la secreción de adipocinas.

SUMMARY

The aim of this study is to characterize perivascular adipose tissue (PVAT) as well as its role in regulating vascular function in hypertensive and prehypertensive spontaneously hypertensive rats (SHR). We have also characterized the vasodilator effect of leptin and we have quantified gene expression of the renin-angiotensin system (RAS) in periaortic and mesenteric AT by means of RT-PCR.

We have shown that alterations in the amount and function of perivascular AT may contribute to the increase of peripheral vascular resistance. SHR shows a lower amount of mesenteric PVAT, smaller adipocytes and lower total lipid content and leptin than WKY rats. The lower amount of PVAT improves vasoconstrictor responses of mesenteric arteries, may be due to a minor paracrine effect of PVAT. Four-week old, prehypertensive SHR already exhibit a lower amount of PVAT than WKY. This difference does not modify basal perfusion pressure or the vasoconstrictor response to KCl. However the anticontractile effect of PVAT in response to vasoconstrictor agents is already lower in prehypertensive SHR. These results suggest that alteration in the amount and function of PVAT are previous to hypertension establishment and might contribute to the development and maintenance of hypertension in SHR.

On the other hand, SHR show lower plasma and mesenteric leptin levels than WKY. We have detected a positive correlation between plasma leptin levels and the amount of PVAT. Leptin-induced vasodilatation was lower in aorta and superior mesenteric artery from SHR. This difference is not due to a down-regulation of the long form of leptin receptor (Ob-Rb), neither to a desensitization of Ob-Rb signalling pathways. These results suggest that the minor effect of leptin in SHR, might contribute to the hypertensive state in this strain. In addition, the short form of leptin receptor (Ob-Ra) was down-regulated in SHR, suggesting a vascular role for this receptor.

We have also carried out a comparative study to analyze differential gene expression of all components on the RAS white and brown PVAT. We have detected a different expression between adipose tissues and also between strains. The most relevant finding is that gene expression of AT_{1a} and AT₂ receptors as well as the tissue concentration of angiotensin II (Ang II) are higher in the mesenteric PVAT. In addition RAS is down-regulated in periaortic adipose tissue from SHR. These results suggest that PVAT RAS might have an effect in the regulation of vascular tone. RAS might also

regulate the amount of PVAT. In fact AngII is considered an adipogenic, trophic factor, involved in growth, differentiation and lipogenesis of adipose tissue as well as in adipokine release.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La presión arterial o tensión arterial es la presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias. Esta presión es imprescindible para que circule la sangre por los vasos sanguíneos y aporte el oxígeno y los nutrientes a todos los órganos del cuerpo para que puedan funcionar. Cuando existe una elevación permanente de la presión arterial se habla de hipertensión arterial (HTA).

El *Séptimo Informe del Joint National Comité sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial* (JNC 7; Chobanian y cols., 2003) ha definido como hipertensión en la población adulta (mayores de 18 años) cuando se detectan cifras mantenidas de presión arterial sistólica (PAS) por encima o iguales a 140 mm Hg y de presión arterial diastólica (PAD) iguales o superiores a 90 mm Hg. Además, define como prehipertensión presiones entre 120/80 mm Hg y 139/89 mm Hg, para identificar personas con alto riesgo de desarrollar hipertensión. Es en este estadio donde se deben revertir los hábitos dietéticos y físicos, a través de modificaciones en el estilo de vida, para prevenir la hipertensión, debido a que los prehipertensos tienen más probabilidades de tener eventos cardiovasculares que los normotensos.

Definición y clasificación de la HTA		
Categoría	Sistólica [mmHg]	Diastólica [mmHg]
Optima	< 120	< 80
Prehipertensión	120 - 139	80 - 89
Hipertensión		
Estadio 1	140 - 159	90 - 99
Estadio 2	≥ 160	≥ 100
Diabéticos *	≥ 135	≥ 85
Sistólica aislada	> 140	< 90

Tabla 1: Clasificación de la HTA para adultos mayores de 18 años. Modificado del JNC 7. * Diabetes tipo 1 y 2.

La HTA es un factor de riesgo importante para las principales complicaciones cardiovasculares, como la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la insuficiencia renal.

En España la prevalencia de HTA en adultos es de aproximadamente un 35% (llega al 40% en edades medias, y al 68% en los mayores de 60 años) y afecta a unos 10 millones de sujetos adultos (Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial: SEH-LELHA, 2002).

La HTA aparece tanto en niños como en ancianos, aunque es mucho más frecuente en el anciano que en la población joven. No existe un valor único como límite de normalidad en el niño. La presión arterial en la infancia es un parámetro variable. Por este motivo se utilizan tablas de referencia de los valores de presión arterial, siendo las más utilizadas internacionalmente las de la *Task Force for Blood Pressure in Children*, publicadas en 1987 y modificadas en 1996, que tienen en cuenta, además de la edad y el sexo, el tamaño corporal (SEH-LELHA 2002).

El anciano tiene un riesgo más elevado de padecer las complicaciones vasculares que los jóvenes hipertensos: angina de pecho, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, hemorragia o trombosis cerebrales y la insuficiencia renal. Esto es debido a que con la edad las arterias pierden elasticidad, se hacen más rígidas y, por tanto, tienen menos capacidad para adaptarse a altas presiones, lo que hace que puedan romperse u obstruirse con mayor facilidad. Por otro lado, el corazón del anciano tiene menos capacidad de soportar el aumento de trabajo que le supone la hipertensión arterial y por tanto más posibilidad de volverse insuficiente. También, en el anciano con la tensión alta, el riñón se afecta con mayor celeridad que en el joven, disminuyendo su capacidad de filtración (SEH-LELHA 2002).

1.1 Tipos de hipertensión

Existen dos tipos de hipertensión. Más del 90% de los casos no tiene una causa única ni conocida y por eso se denomina hipertensión arterial esencial, primaria o idiopática. Es la que padece la gran mayoría de los pacientes.

En el origen de la hipertensión arterial esencial están implicados factores genéticos y ambientales que por distintas vías alteran el equilibrio de las sustancias reguladoras del tono vascular. Como consecuencia de ello se altera la regulación del tono vascular con predominio de la vasoconstricción sobre la vasodilatación, lo que se

traduce en un aumento de las resistencias periféricas. El resultado de ese aumento de las resistencias periféricas es la elevación de la presión arterial.

Aunque la hipertensión esencial es de origen desconocido, se han establecido algunos de los factores que contribuyen a su desarrollo y mantenimiento. Entre ellos se encuentran:

- Base genética
- Estrés
- Obesidad/sobrepeso
- Resistencia a la insulina
- Ingesta elevada de alcohol
- Edad, sexo y raza
- Estilo de vida sedentario
- Ingesta baja de potasio
- Ingesta baja de calcio
- Ingesta elevada de sal en pacientes sensibles a la sal

En un pequeño grupo, puede identificarse una causa, a veces tratable, responsable del aumento de las cifras de presión arterial. Se trata de la hipertensión arterial secundaria, cuyas posibles causas se enumeran a continuación:

- **Hipertensión de origen renal:** Pielonefritis crónica, glomerulonefritis aguda o crónica, poliquistosis renal, estenosis vascularrenal, nefropatía diabética, tumor renal, otros,...
- **Hipertensión de origen endocrino:** Síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo primario, feocromocitoma, hipo/hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, acromegalia, hipercalcemia,....
- **Hipertensión de origen neurológico:** Apnea del sueño, síndrome diencefálico, disfunción del sistema nervioso autónomo, poliomiелitis, polineuritis,...
- **Hipertensión de origen farmacológico:** Anticonceptivos orales (estrógenos), simpaticomiméticos, antidepresivos tricíclicos, intoxicación por talio, antiinflamatorios no esteroideos, corticoides, ciclosporina A, eritropoyetina,...

- **Hipertensión de origen psicógeno:** Estrés, traumatismo craneal severo.
- **Aumento del volumen intravascular:** Transfusiones, Policitemia.
- **Alteraciones vasculares:** Coartación de aorta, fístula arteriovenosa, insuficiencia aórtica
- **Hipertensión relacionada con la gestación**
- **Hipertensión relacionada con sustancias de abuso:** alcohol, cocaína...

II. PATOGENIA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL

La presión arterial sistémica media (PAm) está determinada por el gasto cardiaco (GC) y las resistencias vasculares periféricas (RP) y responde básicamente a la ecuación: $PAm = GC \times RP$. Además del GC y RP, otros dos factores directos son la impedancia (resistencia vascular al flujo) y el volumen arterial diastólico. El GC depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardiaca (FC). A su vez, el volumen sistólico varía según la contractilidad cardiaca y el retorno venoso. Por su parte, las RP están reguladas por factores nerviosos, humorales y locales (Dustan, 1990).

La resistencia vascular sistémica es la resistencia de fricción al flujo de sangre producida por todos los vasos. Entre los distintos segmentos del árbol vascular, los que tienen una importancia relativa mayor son las arterias pequeñas y las arteriolas con diámetros inferiores a 500 μm (Christensen y Mulvany, 2001). Su contribución a la resistencia vascular periférica es aproximadamente de un 70%.

Según la ley de Poiseuille, la resistencia (R) que ofrece el paso de la sangre a través de un vaso depende de la viscosidad de la sangre (η), de la longitud del vaso (L) y, del radio (r), de acuerdo con la siguiente formula: $R = 8 \eta L / \pi r^4$.

Dado que la resistencia es inversamente proporcional a r^4 , el radio de los vasos es el determinante principal de la resistencia vascular sistémica. Por lo tanto, pequeñas variaciones en la luz del vaso ocasionan cambios relativamente grandes en la resistencia vascular. Estos cambios pueden deberse a la contracción y relajación del músculo liso de las paredes, o bien a cambios en la estructura vascular.

La característica hemodinámica fundamental de la hipertensión esencial es el aumento persistente de la resistencia vascular (Bund y Lee, 2003), que se puede

alcanzar a través de diferentes vías. Estas pueden converger tanto en el engrosamiento estructural de la pared como en la vasoconstricción funcional (Kaplan, 2003). Esta alteración también la presentan algunos modelos animales de hipertensión como la rata espontáneamente hipertensa (SHR) (Folkow y cols., 1970) y la rata Dahl sensible a la sal (Folkow, 1982; Boegehold, 1993; Dickhout y Lee, 2000).

La reducción del diámetro de los vasos de resistencia puede ser debido a una alteración funcional –por incremento del tono intrínseco vascular, incremento en la carga neurohormonal o por mayor sensibilidad vascular-, a una alteración mecánica o a un cambio estructural -remodelado vascular- (Intengan y Schiffrin, 2000). Este tipo de alteraciones, a su vez, dependen del modelo animal, de la edad, así como del lecho vascular objeto de estudio (Bund y Lee, 2003).

Los cambios en el GC y RP dependen de la interacción de diversos sistemas que actúan interrelacionados entre sí. El sistema nervioso autónomo, especialmente el sistema nervioso simpático, juega un papel importante en el control circulatorio actuando sobre el tono vascular o por mecanismo reflejo, responde a baroreceptores aórticos y carotídeos liberando noradrenalina (NA) en las terminaciones nerviosas produciendo vasoconstricción y aumento de la FC. Participa en el ajuste rápido de la presión arterial. La reserva corporal de sodio y líquido extracelular, regulan la presión arterial a largo plazo. El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) participa en la regulación del balance hidroelectrolítico, volumen plasmático y RP y se encuentra en la patogénesis de la HTA. La angiotensina II (Ang II), bien directamente, o indirectamente mediante la producción de otros factores vasoconstrictores como catecolaminas, endotelina y tromboxano A₂ (TXA₂) produce un aumento de las resistencias periféricas y por tanto, de la presión arterial (Lahera y cols., 2000). Hormonas locales como las prostaglandinas, endotelinas, el factor natriurético atrial, el óxido nítrico (NO), bradikininas y otros péptidos, como la leptina de la que se hablará en el capítulo II, también influyen en el GC y las RP.

La hipertensión está asociada con un incremento del tono simpático y cambios en la respuesta vascular, como la disminución de la relajación dependiente de endotelio o el aumento de la respuesta a vasoconstrictores como la Ang II, las catecolaminas o la endotelina (Marín, 1993; Mattei y cols., 1997; Marín y Rodríguez-Martínez, 1997). Además, la hipertensión es considerada una enfermedad inflamatoria crónica (Virdis y Schiffrin, 2003), con niveles vasculares y circulatorios elevados de citoquinas pro-

inflamatorias (Wu y cols., 1996; Chou y cols., 1998; Sanz-Rosa y cols., 2005), aumento de la expresión vascular de la ciclooxigenasa 2 (COX- 2) (Henrion y cols., 1997; García-Cohen y cols., 2000; Briones y cols., 2002; Tomida y cols., 2003) y activación del factor de transcripción NF-kB (Sanz-Rosa y cols., 2005). Además, los productos contráctiles de la COX-2 pueden contribuir a la disfunción endotelial (Widlansky y cols., 2003) y al incremento de la respuesta vasoconstrictora (Zerrouk y cols., 1998) descrita en la HTA.

En la siguiente figura se esquematizan los diversos mecanismos que pueden participar en la fisiopatología de la HTA.

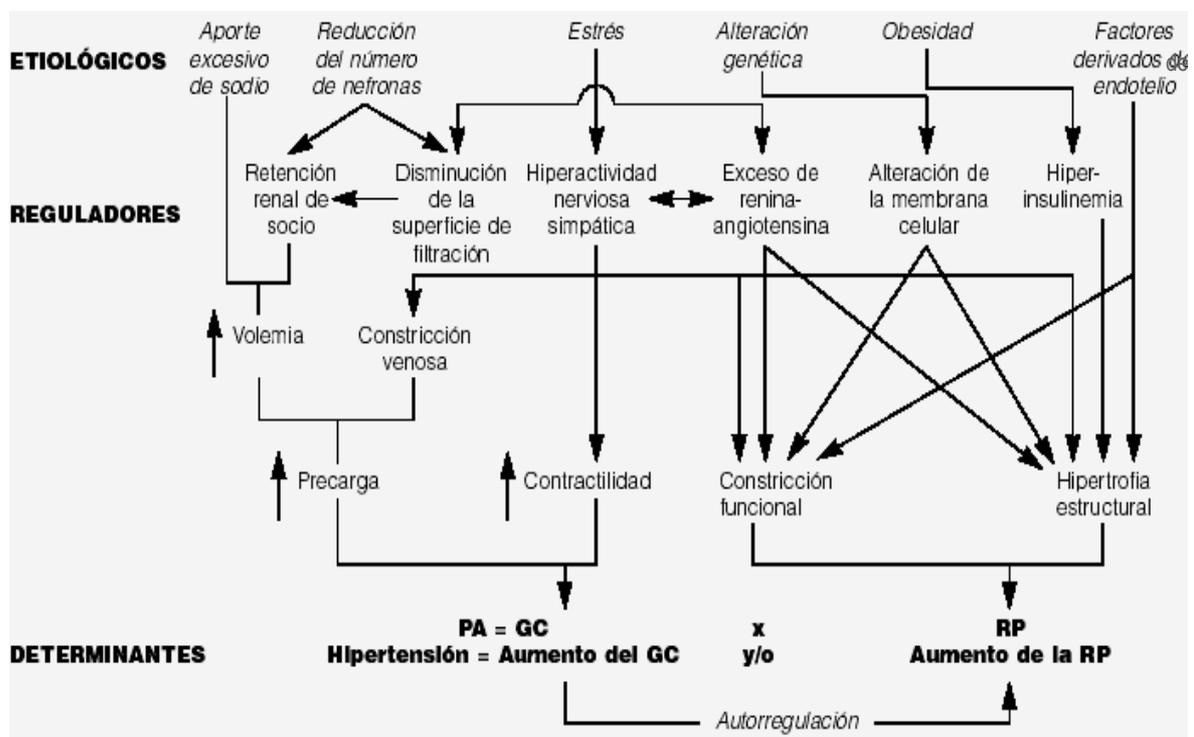


Figura 1: Factores que influyen en el control de la presión arterial. Tomado de Maicas y cols., 2003.

2.1. La rata SHR como modelo animal de hipertensión

La rata SHR es un modelo animal frecuentemente utilizado para el estudio de la hipertensión esencial. La cepa SHR fue desarrollada por el grupo de Okamoto mediante la selección y el cruce de ratas Wistar Kyoto (WKY) que presentaban una elevada presión arterial (Okamoto y cols., 1963).

La cepa WKY se estableció en 1971 como control normotenso. Se desarrolló a partir de una colonia Wistar Kyoto a través del cruce entre hermanos (Kurtz y cols., 1987). El grado de diferencia genética entre la SHR y la WKY es sustancial, en un grado comparable con la máxima divergencia que existe en el hombre entre individuos no relacionados (St Lezin y cols., 1992; Johnson y cols., 1992, para revisión Doggrell y Brown, 1998).

La rata SHR es un modelo adecuado para el estudio de la hipertensión esencial humana porque presenta diversas similitudes, que incluyen una predisposición genética a una elevada presión arterial sin una etiología conocida, un incremento de la resistencia total periférica sin una expansión de volumen y una respuesta similar al tratamiento farmacológico (Frohlich, 1986; Dickhout y Lee, 1998). Estudios realizados *in vivo* han mostrado que en las primeras fases de la hipertensión, la rata SHR presenta un incremento del gasto cardíaco sin cambios en la resistencia periférica. Cuando la SHR progresa a una situación de hipertensión establecida, el gasto cardíaco retorna a valores normales, incrementándose la resistencia periférica total (Smith y Hutchins, 1980), de forma similar a lo que sucede en el ser humano (Palatini y Julius, 1997).

Además, la rata SHR se usa como modelo de hipertensión humana establecida porque sigue la misma progresión que los pacientes hipertensos, con una fase de pre-hipertensión, seguida por una fase de desarrollo y un periodo donde la hipertensión está establecida. Estos periodos en la rata SHR tienen una duración de varias semanas lo que permite su estudio (Folkow, 1993). El periodo de desarrollo de la hipertensión difiere entre la rata SHR y la hipertensión humana porque en este modelo la elevación se produce a edades tempranas mientras que en los pacientes hipertensos el desarrollo se produce generalmente en un periodo intermedio de su edad adulta.

Como ocurre en el ser humano, la hipertensión se desarrolla más rápidamente en ratas macho que en hembras llegando a ser también más severa (Iams y Wexler, 1979).

En la rata SHR se ha observado una sobre-expresión de la acción de un factor constrictor como prostaglandina H₂ (PGH₂) o TXA₂ y un incremento de los radicales libres de oxígeno (ROS) que mermarían el efecto del NO. También se ha observado un aumento de la respuesta a noradrenalina (Dickhout y Lee, 1997), Ang II (Schiffrin y cols., 1993) y un mayor tono miogénico (Luscher y cols., 1986; Deng y cols., 1992; Izzard y cols., 1996). Otros autores han observado una reducción de la relajación

producida por acetilcolina (Ach) o por el flujo relacionando estas alteraciones con el NO.

Además en la rata SHR se ha observado un incremento de la rigidez de la pared arterial mesentérica, que reduce la distensibilidad vascular, originado por un aumento en la deposición de colágeno o por un incremento de la relación colágeno/elastina o a ambos (Sharifi y cols., 1998; Intentan y cols., 1999b). También se ha propuesto que el incremento en la rigidez de las arterias de resistencia es debido a una alteración de la organización de la elastina en la lámina elástica interna. Por lo tanto, aunque la elastina es una proteína minoritaria en estos vasos, desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la estructura vascular y en las propiedades mecánicas de las arterias de resistencia (Briones y cols., 2003).

III. SISTEMA CARDIOVASCULAR E HIPERTENSIÓN ARTERIAL

El sistema vascular participa de forma decisiva en el mantenimiento de la homeostasis vascular, ya que los vasos sanguíneos no son simples conductos que transportan la sangre y con ella los nutrientes y el oxígeno a los tejidos, sino que las distintas estructuras que componen la pared vascular participan activamente en importantes funciones fisiológicas que van a regular tanto el tono vasomotor, como el crecimiento de las células del músculo liso, los procesos de agregación plaquetaria y coagulación, la permeabilidad o las interacciones de los leucocitos con la pared vascular.

3.1 Estructura de la pared vascular

Desde un punto de vista histológico la organización básica de la pared arterial está formada por tres capas celulares o tunicas dispuestas de manera concéntrica: una capa externa o túnica adventicia, una capa intermedia o túnica media y una capa interna o túnica íntima. La separación de estas tres capas contiguas está definida por una lámina elástica interna contnua, que separa la túnica íntima de la túnica media y por la lámina elástica externa fragmentada, que marca la frontera entre la túnica media y la túnica adventicia.

La **túnica adventicia** separa el vaso sanguíneo de los tejidos adyacentes. Contiene las terminaciones nerviosas perivasculares que llegan al vaso sanguíneo y ejercen sobre éste el control nervioso. La proporción de pared ocupada por la adventicia es variable según el lecho vascular, siendo reducida en las pequeñas arterias cerebrales y mayor en las grandes arterias (Mulvany, 1986). La adventicia está constituida, principalmente, por haces de colágeno orientados longitudinalmente, fibroblastos, mastocitos, macrófagos, así como por una red laxa de fibras elásticas delgadas por donde penetran las terminaciones nerviosas y los capilares (*vasa vasorum*). En los lechos mesentérico y renal de la rata, la densidad de los nervios dentro de la pared vascular aumenta conforme disminuye el diámetro del vaso, desde aproximadamente el 1% en las arterias pequeñas proximales, al 3 % en las distales (Lee y cols., 1983a).

Esta capa participa de forma directa en la modulación de la función vascular (González y cols., 2001). Los neurotransmisores liberados de las terminaciones nerviosas simpáticas y vagales modulan el tono vascular. Además, estos pueden actuar como un mecanismo compensatorio, cuando la función endotelial está alterada (Gutterman, 1999). También modula la respuesta a agentes vasoconstrictores como la Ang II, al mediar la liberación de NO endotelial a través de la activación de los receptores AT₂ de la Ang II presentes en esta capa (Somoza y cols., 2005).

Además, la adventicia juega un papel muy importante en procesos como la aterosclerosis y la hipertensión. La sensibilidad de los fibroblastos de la adventicia a estímulos locales implicados en la producción de NAD(P)H oxidasa, generada por las especies reactivas de oxígeno, podría afectar la función de la pared vascular, incluyendo la disfunción endotelial y la proliferación de las células de músculo liso vascular (Rey y cols., 2002).

La **túnica media** está constituida fundamentalmente por células de músculo liso vascular fusiformes que se disponen en espiral o circularmente formando varias capas alrededor de la circunferencia del vaso y que contienen filamentos de actina y miosina, al igual que el músculo estriado. El número de capas de células musculares lisas dentro de la media de las arterias se reduce al disminuir su diámetro. Esta capa también está compuesta por haces de colágeno, fibras elásticas y otros componentes de la matriz extracelular intersticial. Además, en esta capa es donde se localizan los receptores de multitud de neurotransmisores, factores locales y hormonas. Las células musculares se

contraen o relajan en respuesta a diversos estímulos, de esta forma reducen o aumentan el diámetro interno de la pared vascular, regulando así, el flujo sanguíneo.

La matriz extracelular está formada por fibras de elastina y colágeno, las cuales se encuentran en un gel compuesto por ácido hialurónico, glucoproteínas, proteoglicanos y agua. La función de la elastina es dotar al vaso sanguíneo de elasticidad, mientras que el colágeno mantiene la forma de la pared vascular a pesar de la presión intraluminal ejercida por la sangre (Rhodin, 1980). Por todo ello, la matriz es un componente de gran importancia en la distensibilidad arterial.

La **túnica íntima** o endotelio se encuentra en contacto directo con la sangre. Está constituida por una monocapa de células endoteliales unidas firmemente entre sí, con su eje mayor orientado longitudinalmente respecto a la dirección del flujo sanguíneo y por una membrana basal. Las superficies endoteliales lumbales pueden formar arrugas que se proyectan dentro de la luz del vaso, además de las ondulaciones endoteliales observadas durante la contracción (Greensmith y Duling, 1984). Se ha observado que las células endoteliales se proyectan frecuentemente a través de fenestraciones de la lámina elástica interna y pueden hacer contacto con las células musculares lisas vasculares dentro de la túnica media (Carlson y cols., 1982). El conjunto de las células endoteliales forma el endotelio, tejido de gran importancia en la regulación del tono vascular.

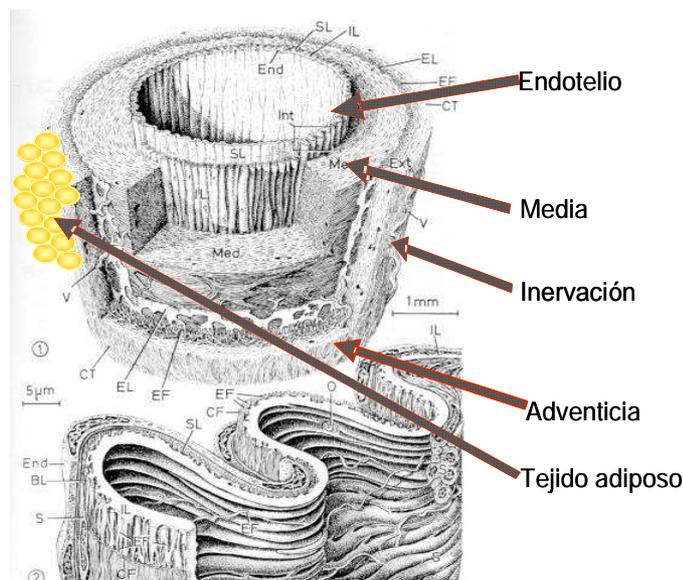


Figura 2: Histología de una arteria. Capas vasculares.

3.2 El endotelio y la regulación del tono vascular

Actualmente es considerado el principal órgano de regulación vascular con acción paracrina, autocrina y endocrina que está implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes (Feletou y Vanhoutte, 2006). Para que el endotelio pueda ejercer todas estas funciones es necesaria la integridad anatómica y funcional del mismo.

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y el músculo liso vascular. Las células endoteliales son capaces de detectar variaciones de tipo mecánico como cambios hemodinámicos de la presión o las fuerzas de cizallamiento de la sangre, químico como la presión de oxígeno, humorales como las modificaciones de los factores circulantes o locales y cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos. El endotelio va a traducir dichas modificaciones respondiendo a ellas mediante la síntesis y liberación de numerosos factores biológicamente activos que van a regular la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la hemostasis, así como el tono y la permeabilidad vascular (Feletou y Vanhoutte, 2006).

Entre estos cabe destacar distintos factores vasoactivos como la prostaciclina (PGI₂) el NO, el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), el TXA₂, la prostaglandina H₂ (PGH₂), o la endotelina-1 (ET-1). Así como distintas especies reactivas de oxígeno (aniones superóxido e hidroxilo, o peróxido de hidrógeno), de diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante β (TGFβ), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), heparinoides, el activador del plasminógeno tisular (t-PA), el inhibidor del activador del plasmonógeno-1 (PAI-1), quimiocinas, interleucinas, moléculas de adhesión de monocitos (ICAM-1, VCAM-1, ELAM o E-selectina) y otros.

De esta forma, la organización de la pared del vaso, hace posible, por una parte, la modulación por las células endoteliales de la respuesta de contracción-relajación o de los procesos de crecimiento de la capa muscular adyacente. Por otra parte, permite al endotelio interactuar con la sangre regulando la adhesión de las células sanguíneas a

la pared y los procesos de agregación plaquetaria y coagulación a través de las acciones vasodilatadoras, antiagregantes y antiproliferativas de los factores como la PGI₂, el NO o el EDHF, y de las acciones vasoconstrictoras, proagregantes y proliferativas de los factores como el TXA₂, la PGH₂, la ET-1, los radicales libres, los factores de crecimiento o las moléculas de adhesión (Gibbons, 1997; Haller, 1997).

Las variaciones en el flujo sanguíneo producen una deformación mecánica de la membrana endotelial. En esta situación, las células endoteliales actúan como barorreceptores locales que regulan los cambios en la presión y controlan el diámetro arterial. La vasodilatación dependiente del flujo sanguíneo está relacionada con la activación de canales de potasio que, a su vez, producen la liberación de NO (Cook y cols., 1991).

Las células endoteliales, sobre todo en vasos de pequeño calibre, también se comportan como sensores fisiológicos de los cambios en la tensión de oxígeno. En situaciones de hipoxia estas células no sólo liberarían NO (Pohl y cols., 1988; Ånggård, 1992), sino también endotelina, agente vasoconstrictor derivado del endotelio (Kourembanas y cols., 1991), contribuyendo de esta forma a la regulación local del vaso sanguíneo.

Los factores endoteliales que modulan la relajación y la contracción del músculo liso vascular se clasifican en tres grupos: factores relajantes derivados de endotelio, como la PGI₂, el NO, factores contráctiles derivados de endotelio, como los endoperóxidos, el TXA₂, los radicales libres de oxígeno (ROS), la Ang II y la endotelina y en factores hiperpolarizantes derivados de endotelio (EDHF) (Pearson & Vanhoutte, 1993; Vanhoutte, 1996). En algunas situaciones patológicas, como por ejemplo, la hipertensión, existe una menor respuesta relajante dependiente de endotelio (Vanhoutte y cols., 2005). Esta menor respuesta relajante observada en las arterias de resistencia de ratas SHR se ha propuesto que puede deberse a una disminución de la liberación de factores relajantes derivados de endotelio (Grunfeld y cols., 1995), a un incremento en la liberación de los factores contráctiles (Lüscher & Vanhoutte, 1986; Watt & Thurston, 1989; Diederich y cols., 1990) o una reducción en la liberación de EDHF (Fujii y cols 1992, 1993; Sunano y cols., 1999). Por tanto, desequilibrios en la liberación de estos factores pueden ocasionar cambios en la presión arterial sistémica.

La influencia de estos factores endoteliales en la regulación del tono vascular varía en función del tipo de vaso sanguíneo (Pearson y Vanhoutte, 1993; Vanhoutte, 1989; Nagao y cols., 1992). Así, en las arterias de conducción como la aorta y la arteria pulmonar, la relajación dependiente de endotelio está mediada principalmente por el NO y en las arterias de resistencia (lecho vascular mesentérico), el principal responsable de la respuesta relajante es el EDHF (Hwa y cols., 1994; Shimokawa y cols., 1996; Tomioka y cols., 1999; Nagao y cols., 1992, Le Marquer-Domagala y Finet, 1997; Garland y cols., 1995). Una situación intermedia se observa en la arteria coronaria descendente donde tanto el NO como el EDHF participan en la respuesta relajante a la acetilcolina, siendo el NO el principal mediador de esta relajación (Maeso y cols., 1998). La contribución relativa de los factores relajantes derivados del endotelio varía en función del agente vasodilatador que se considere. Así, en la vasorrelajación inducida por un agonista β -adrenérgico como el isoproterenol, el principal factor que medía su relajación es el EDHF, jugando el NO un papel secundario (Vázquez-Pérez y cols., 2001). Todo esto sugiere que la participación relativa de los factores endoteliales que inducen la relajación producida por los vasodilatadores dependientes de endotelio es diferente en función del mecanismo de transducción activado por ellos. Por lo tanto, y en función del lecho vascular, la disfunción endotelial puede ser consecuencia de alteraciones en la disponibilidad no sólo de NO sino también de EDHF. Entre estos factores existe un equilibrio, de tal manera que en aquellas circunstancias que se produce una modificación, bien por aumento o disminución, en uno de ellos va a ser compensada, al menos parcialmente, por los otros.

3.2.1 Disfunción endotelial

Las alteraciones estructurales y/o funcionales del endotelio vascular están presentes en numerosas situaciones patológicas, entre las que se incluye la hipertensión arterial. De forma general, se puede definir la disfunción endotelial como una serie de alteraciones que afectan la síntesis, la liberación, la difusión o la degradación de los diversos factores derivados del endotelio (Haynes y cols., 1998; Mombouli y cols., 1999; Poredos, 2002; Lahera y cols., 2003). Los mecanismos responsables de dichas alteraciones pueden ser originados tanto por cambios a nivel de los receptores como de las señales intracelulares de transducción, o incluso por modificaciones en la respuesta de las células diana de dichos factores. La disfunción endotelial no es homogénea en sus

características y su distribución, varía en función de la patología asociada, así como con el lecho vascular que se considere (Puddu y cols., 2000; Lahera y cols., 2003; Feletou y Vanhoutte, 2006).

El principal mecanismo inductor y mediador de la disfunción endotelial en pacientes con hipertensión esencial es la presión arterial elevada, responsable de un incremento de las fuerzas de cizallamiento sobre las células endoteliales vasculares, que deriva finalmente en una alteración en la producción de los factores producidos por el endotelio (Lahera y cols, 2003).

La disfunción endotelial en un sentido amplio se caracteriza por: 1) una alteración de la regulación del tono vasomotor, con una respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio reducida (Vanhoutte, 1996) o una mayor respuesta constrictora dependiente o independiente de endotelio y donde las especies reactivas de oxígeno juegan un papel determinante; 2) una tendencia al crecimiento de la pared vascular que puede ser debido a un aumento del número y/o tamaño de las células musculares lisas y/o fibroblastos, una disminución de la apoptosis de éstas y/o un aumento de la síntesis de matriz extracelular; 3) un incremento en la permeabilidad del endotelio, con la consiguiente pérdida de la función de barrera selectiva para diversas partículas y macromoléculas; 4) un aumento de la adhesión de leucocitos debido a la sobre-expresión de moléculas quimiotácticas y de adhesión, junto con una respuesta elevada a citoquinas y liberación de mediadores inflamatorios; 5) una mayor tendencia a la agregación plaquetaria y a la adhesión de éstas a las células endoteliales; 6) una mayor tendencia a la coagulación y una fibrinólisis ineficaz, aumentando el riesgo de trombosis. Todo ello conlleva una elevación de las resistencias vasculares periféricas totales y al mantenimiento o agravamiento de la hipertensión arterial.

En las ratas SHR la disfunción endotelial es atribuida en parte a un predominio de las respuestas contráctiles dependientes de endotelio (Lüscher & Vanhoutter, 1986), la producción de especies reactivas de oxígeno, la activación de la ciclooxygenasa endotelial (COX-1), y la estimulación de los receptores de TXA₂ localizados en las células del músculo liso vascular (Lüscher & Vanhoutter, 1986; Gluais y cols., 2005).

Por lo tanto, una biodisponibilidad reducida del NO, una alteración en la producción de prostanoïdes, incluyendo la prostaciclina, el TXA₂, y/o los isoprostanos, una menor hiperpolarización dependiente de endotelio, así como un aumento de ET-1,

pueden individualmente o en la asociación contribuir a la disfunción endotelial (Feletou y Vanhoutte, 2006).

3.3 Cambios estructurales en el sistema vascular

La elevación prolongada de las cifras de presión arterial tiene dos consecuencias directas sobre la pared de los vasos: se altera la función normal del endotelio y se modifica la estructura de la pared vascular (Folkow, 1982; Mulvany, 1993), fenómeno que se conoce con el nombre de remodelado vascular. Esta doble alteración vascular unida a la sobrecarga tensional crónica compromete la perfusión, la estructura y la función de los distintos órganos siendo los más afectados el corazón, el riñón y el cerebro, por ello considerados órganos diana de la HTA.

En diferentes modelos animales de hipertensión arterial, incluyendo SHR, se ha descrito una exagerada producción de anión superóxido en la pared vascular (Suzuki y cols., 1995; Dohi y cols., 1990). Un número creciente de evidencias sugiere que el exceso de aniones superóxido puede estar implicado en la disfunción endotelial hipertensiva y puede participar en el remodelado hipertensivo de la pared vascular estimulando el crecimiento de las células musculares lisas vasculares y facilitando la hipertrofia de la capa media (Grunfeld y cols., 1995; Tschudi y cols., 1996; Schnackenberg y cols., 1998; Li y cols., 1997; Zafari y cols., 1998).

La Ang II también favorece el remodelado de la pared vascular e interviene también en la patogenia de la aterosclerosis, al participar en la migración y proliferación de las células musculares lisas, favoreciendo a su vez el paso de fenotipo contráctil al sintético, lo que determina la producción de la matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos) (Kato y cols., 1991; Pratt y Dzau, 1993) y al aumentar la formación intracelular los aniones superóxido a través de actividades enzimáticas como la NADH/NADPH-oxidasa estimulando alguna de las subunidades de este complejo enzimático (como por ejemplo, el p22phox) (Ushio-Fukai y cols., 1996; Rajagopalan y cols., 1996).

El remodelado eutrófico (diámetro de la luz vascular disminuido con volumen de pared por unidad de longitud conservada) e hipertrófico (diámetro de luz vascular disminuido con volumen de pared por unidad de longitud aumentada) se observa en las paredes de las pequeñas arterias, lo cual produce aumento de la resistencia vascular

periférica e incremento de la presión arterial, disminución del flujo e isquemia tisular, a lo que se agrega la disfunción endotelial y las consecuencias de ésta: las respuestas contráctiles anormales (Schiffrin, 1998).

En las medianas y grandes arterias el remodelado prevalente es el excéntrico (diámetro de la luz vascular incrementado con volumen de pared por unidad de longitud aumentada o disminuida), con alteración de las propiedades mecánicas de las paredes y aumento de la rigidez, presentando estas arterias, además, placas ateroscleróticas que asientan especialmente en el sitio de las bifurcaciones arteriales (Schiffrin, 1998).

El espesor de la íntima-media de los vasos periféricos se encuentra aumentado en aproximadamente el 30% de los hipertensos independientemente de la edad. El aumento en la íntima-media podría estar expresando los cambios adaptativos de la pared al flujo alterado, al aumento de presión y al incremento de la fuerza de estiramiento. Además, los vasos de resistencia de los hipertensos presentan un incremento en el espesor de la capa media, un mayor índice media-lumen y un área media mayor, comparados con arterias de similares características de las personas normotensas, lo cual corrobora el remodelado vascular de los vasos periféricos en la hipertensión esencial (Schiffrin, 1998).

Los cambios estructurales se producen a nivel de: a) ventrículo izquierdo, mediante el remodelado y posterior hipertrofia ventricular izquierda; b) arteriolas de resistencia, con remodelado de sus paredes que amplifica la resistencia vascular periférica; c) microvascular, con disminución de la superficie capilar a nivel de diversos órganos y del músculo estriado (fenómeno de rarefacción vascular), que puede favorecer la resistencia a la captación de glucosa por el músculo y la consiguiente resistencia a la insulina y d) aorta y grandes vasos, reduciendo la elasticidad que contribuirá a incrementar más aún el componente sistólico (Maicas y cols., 2003).

Las ratas SHR de 3-4 semanas de edad ya presentan importantes cambios estructurales a nivel de las arterias mesentéricas de resistencia, a pesar de que presentan niveles de presión arterial normales o similares a los de las ratas WKY. Estos cambios incluyen un incremento del volumen de la capa media y del número de capas de células musculares lisas, sin disminución del diámetro de la luz del vaso. Esto sugiere que estos cambios estructurales de las pequeñas arterias son los primeros cambios que contribuyen al desarrollo de la hipertensión arterial en SHR debido a que están

presentes en una edad en la que la presión arterial es similar en SHR y WKY (Dickhout y Lee, 1997).

IV. FACTORES VASODILATADORES DERIVADOS DE ENDOTELIO: NO Y EDHF

4.1 Óxido nítrico

El NO es un potente agente vasodilatador que se libera del endotelio en respuesta a distintos estímulos fisiológicos, como cambios en el flujo sanguíneo o shear stress (estrés de cizallamiento), variaciones en la tensión de oxígeno, o bien por sustancias vasoactivas como Ach, NA, serotonina (5-HT), adenosin trifosfato y difosfato (ATP y ADP, respectivamente), bradicinina, sustancia P (SP), trombina, etc.

La estructura de radical libre con un electrón desapareado en su último orbital, le confiere una elevada reactividad (Stamler y cols., 1997). En condiciones biológicas, las concentraciones de NO son relativamente bajas ($<1\mu\text{M}$) permitiéndole interactuar principalmente con los grupos hemo de algunas proteínas como la guanilato ciclasa soluble (GCs), la hemoglobina, el citocromo p450 o la protoporfirina IX. Pero también puede interactuar con proteínas que no tengan el grupo hemo, como las que contienen zinc, los radicales proteicos, las ribonucleótido reductasas y las ciclooxygenasas.

Tiene una vida media muy corta 5-6 seg (Rubanyi y cols., 1985; Gryglewski y cols., 1986a). Se inactiva en presencia de radicales libres de oxígeno, sobre todo de aniones superóxido (O_2^-) (Gryglewski y cols., 1986b; Rubanyi y Vanchoutte, 1986), hemoglobina, Fe^{2+} , situaciones de hiperoxia y azul de metileno, entre otros (Moncada y cols., 1986).

En el caso de la hipertensión se ha observado que el anión superóxido (O_2^-) reacciona con el NO impidiendo que éste ejerza su función biológica (Gryglewski y cols., 1986). La interacción del NO con el O_2^- genera peroxinitrito (ONOO^-), una especie de oxígeno altamente reactiva, que produce efectos negativos como la peroxidación de lípidos, la generación de óxidos de nitrógeno y aldehídos, así como la nitración de proteínas incluyendo las lipoproteínas de baja densidad LDL (Krumenacker y cols., 2004).

4.1.1 Biosíntesis del óxido nítrico

El NO proviene del átomo de nitrógeno imínico del grupo guanidino de la L-arginina (Palmer y Moncada, 1989; Moncada y cols., 1991). El enzima encargado de la síntesis de NO es la sintasa de NO, también llamada NO sintasa (NOS) (Moncada y cols., 1991). La NOS transforma la L-arginina en L-citrulina liberando en esta reacción enzimática NO.

La NOS es una hemoproteína que para su actividad, además de la L-arginina, requiere como co-sustratos oxígeno y nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Además, para que se lleve a cabo la reacción es necesaria la unión de varios cofactores al enzima, como flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄). La BH₄ no sólo participa como cofactor del enzima en la formación de NO, sino que también es necesario para el mantenimiento y estabilización de la NOS (Alderton y cols., 2001).

La NOS puede ser inhibida por competición por análogos de la L-arginina el N-nitro-L-arginina-metilester (L-NAME) un inhibidor no selectivo de las tres isoformas de la NOS (Rees y cols., 1990).

Hasta la fecha se han identificado, clonado y caracterizado tres isoformas de la NOS, codificadas por diferentes genes, con distinta localización, regulación y propiedades catalíticas y que comparten en humanos una homología de un 50-60 % en su secuencia de aminoácidos (Nathan y Xie, 1994). Estas tres isoformas son conocidas internacionalmente como NOS neuronal (nNOS, también denominada tipo I, NOS-I o NOS-1, con un peso molecular de 160 kDa), NOS inducible (iNOS, también denominada tipo II, NOS-II o NOS-2, con un peso molecular de 130 kDa) y NOS endotelial (eNOS, también denominada tipo III, NOS-III o NOS-3) (Alderton y cols., 2001). De estas tres isoformas, la eNOS y la nNOS son constitutivas, mientras que la iNOS es inducible.

La activación de las formas constitutivas requiere una elevación de calcio intracelular y la consiguiente activación de la calmodulina, formándose un complejo Ca²⁺/calmodulina e iniciándose de esta forma el flujo de electrones al centro activo del enzima (Gachhui y cols., 1996;1998). Estas formas constitutivas, son, por tanto, enzimas Ca²⁺/calmodulina dependientes, disminuyendo su actividad en presencia de quelantes de calcio.

Por el contrario, la isoforma iNOS es inducible e independiente de calcio. La

iNOS está regulada, sobre todo, a nivel transcripcional, es decir, requiere la estimulación de la síntesis proteica para su expresión. Además, la iNOS, una vez expresada, posee una unión fija a la calmodulina durante todo el tiempo, situación que permite al enzima ser independiente de los niveles de Ca^{2+} . La iNOS presenta una alta afinidad por el complejo Ca^{2+} /calmodulina a las concentraciones de Ca^{2+} normales presentes en las células (Nathan y Xie, 1994). Por este motivo, la unión al enzima es irreversible y la iNOS está continuamente activada, por lo que una vez inducida, produce elevadas cantidades de NO durante periodo prolongados de tiempo. Por esta razón, esta enzima se asocia sobre todo con procesos infecciosos e inflamatorios, actuando como mecanismo de defensa del organismo.

Además de estas tres isoformas de NOS, en los últimos años se ha postulado la existencia de una cuarta forma asociada a la mitocondria, la m NOS (NOS mitocondrial) (Ghafourifar y Richter, 1997; Giulivi, 1998). Esta isoforma podría estar jugando un importante papel en la respiración celular y en la generación de ATP en la célula.

4.1.2 *Dianas del óxido nítrico*

El NO ejerce su actividad biológica de forma autocrina como paracrina, por difusión a través de la membrana plasmática, actuando tanto en el citoplasma como en el núcleo. En los vasos sanguíneos el NO se genera en las células endoteliales y en las terminaciones nerviosas perivasculares. El mecanismo de acción por el cual el NO produce un efecto sobre la musculatura lisa está basado en la activación de la enzima GCs de las células musculares, considerado como la principal diana del NO. Esta enzima cataliza la conversión de GTP en GMPc (Denninger y Marletta, 1999). El GMPc actúa como un segundo mensajero sobre diversas estructuras celulares. Son numerosas las dianas descritas por las que el GMPc induce relajación del músculo liso. Puede ser debido a una activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) (Moncada y cols., 1991; Lohmann y cols., 1997), que dirige la defosforilación de la cadena ligera de miosina (Moncada y cols., 1991; Änggard, 1992). También, como consecuencia de la activación del GMPc, se produce una disminución de los niveles de calcio intracelular, debida a: 1) una inhibición de la generación de inositol trifosfato IP3 (Hirata y cols., 1990), 2) un secuestro del calcio intracelular, probablemente por el retículo endoplásmico (Lincoln, 1983), 3) una inhibición de la permeabilidad del calcio

a través de los canales iónicos dependientes de GMPc (Mery y cols., 1991; Zagotta y cols., 1996), 4) una inhibición de las fosfodiesterasas reguladas por GMPc (Degerman y cols., 1997; Houslay y cols., 1997) o bien 5) una activación de los canales de K^+ produciendo de esta forma un aumento de la permeabilidad para el potasio, originando hiperpolarización (Bolotina y cols., 1994; Ferrer y cols., 1999).

Mediante la activación de la GCs, el NO también inhibe la adhesión y la agregación plaquetarias. De esta forma, el NO derivado de endotelio no sólo actuaría regulando el calibre del vaso sanguíneo, sino también disminuyendo el riesgo de trombosis al inhibir la agregación plaquetaria (Vanhoutte, 1992).

También puede interactuar con el grupo hemo de la NOS inhibiendo de esta forma su propia síntesis a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Nathan y Xie, 1994), con proteínas G, PKC y canales de calcio activados por voltaje (Lane y Gross, 1999; Moncada, 1999).

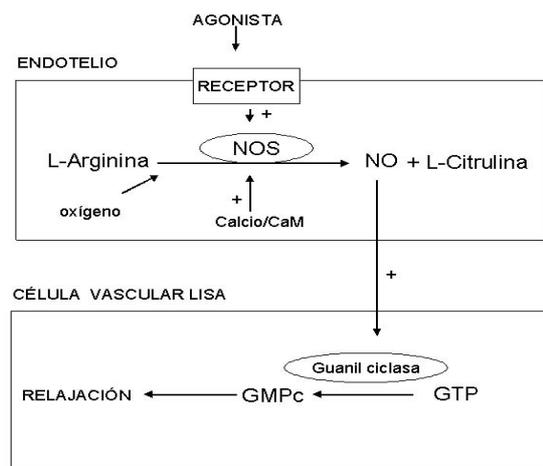


Figura 3: Representación de la biosíntesis de NO endotelial y de su efecto sobre el músculo liso vascular. (+) activación.

El NO inhibe la cadena de transporte electrónico mitocondrial, disminuyendo la síntesis de ATP, por lo que se reducen las reservas de energía disponibles en la célula (Moncada, 1999). Por otro lado, el NO puede inducir la ADP-ribosilación de distintas clases de proteínas. Es el caso de la actina-G de los neutrófilos. El NO inhibe su polimerización y por tanto la adhesión de los neutrófilos y de las células endoteliales (Clancy y Abramson, 2000).

Por lo tanto, el NO tiene un efecto vasodilatador del músculo liso vascular, antiproliferativo, antigregante plaquetario, antiadherente de leucocitos y estimulador de

la fibrinólisis. Es decir, el NO regula todas las funciones vasculares, por lo que se considera el principal y más importante factor derivado del endotelio. Asimismo, cuando la síntesis y/o liberación de NO es deficiente la capacidad homeostática del endotelio vascular empeora y constituye uno de los acontecimientos claves de la llamada disfunción endotelial y su papel protector frente a fenómenos isquémicos, hipertensivos, ateroscleróticos y trombóticos desaparece (Lahera y cols., 2003; Krumenacker y cols., 2004).

4.2 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio: EDHF

El endotelio, además del NO y la PGI₂, también sintetiza y libera EDHF, que induce la relajación vascular al producir la hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso (Feletou y Vanhoutte, 1988).

A pesar de que todavía no se conoce la naturaleza exacta del EDHF, podrían existir diversas sustancias con esta actividad (Mombouli y Vanhoutte, 1997). Algunos autores proponen que se trata de un factor difusible liberado por el endotelio (Edwards y cols., 1998; Campbell y Harder, 2001; Campbell y Gauthier, 2002) como el ion K⁺, o un metabolito lábil derivado del ácido araquidónico a través de la vía del citocromo P450 como el ácido epoxieicosatrienoico (Cohen y Vanhoutte, 1995). Otros autores proponen que se trata de una hiperpolarización de la célula endotelial que es capaz de trasladarse eléctricamente a las células musculares lisas, probablemente a través de las uniones de nexo mioendoteliales (Little y cols., 1995; Chaytor y cols., 2001; Yamamoto y cols., 1999; Sandow y Hill, 2000). Asimismo, es posible que existan varios EDHF dependiendo del lecho vascular y especie.

El efecto vasodilatador del EDHF está mediado por la activación de los canales de potasio en las células musculares lisas vasculares. Aunque el subtipo de canal de potasio que participa en esta actividad no se ha identificado plenamente, parece que en la relajación inducida por el EDHF es más probable que participen los canales de potasio activados por calcio que los dependientes de ATP (Mombouli y Vanhoutte, 1997). Se ha documentado vasorrelajación mediada por EDHF tanto en animales como en humanos (Nakashima y cols., 1993; Urakami-Harasawa y cols., 1996). Además, como comentamos anteriormente, la contribución del EDHF a la relajación vascular dependiente del endotelio aumenta a medida que disminuye el diámetro de los vasos, tanto en animales

como en humanos (Urakami-Harasawa y cols., 1996; Shimokawa y cols., 1996; Hwa y cols., 1994; Tomioka y cols., 1999).

Se libera *in vitro* por acción de concentraciones elevadas de Ach o de bradiquinina (Mombouli y cols., 1992; Fujii y cols., 1992), por lo que cabe suponer que media, al menos parcialmente, la acción vasodilatadora de estos agentes. En este sentido se ha descrito que el EDHF contribuye de forma importante en la relajación dependiente de endotelio inducida por la bradiquinina en un gran número de vasos sanguíneos (Mombouli y cols., 1992). También, se ha observado la liberación de EDHF estimulado por agentes vasoconstrictores, como la endotelina (ET-3), lo que podría modular su acción constrictora (Nakashima y Vanhoutte, 1993). Además, podría tener cierta importancia en algunas situaciones fisiopatológicas, ya que se ha demostrado que durante el envejecimiento, así como en la hipertensión las hiperpolarizaciones dependientes de endotelio inducidas por la Ach en arterias mesentéricas de rata están disminuidas (Fujii y cols., 1992; Fujii y cols., 1993).

Para facilitar la investigación de las respuestas a EDHF es necesario eliminar la actividad de otros mediadores derivados de endotelio, la PGI₂ y el NO, que también producen la hiperpolarización de las células musculares lisas e interfieren con la liberación y la actividad del EDHF (Bauersach y cols., 1996). Generalmente se utilizan L-NAME e indometacina, como inhibidores de la NOS y de la COX, respectivamente. En estas condiciones, la relajación dependiente de endotelio puede ser atribuida al EDHF (White y Hiley, 1997; Lacy y cols., 2000). Además, para inhibir la actividad del EDHF se han utilizado el tetraetilamonium (TEA), concentraciones de potasio de 20-25 mM (Adeagbo y Triggle, 1993) y la brefeldina A (Bauersachs y cols., 1997).

V. CANALES DE POTASIO EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR

Los canales de potasio son estructuras proteicas que permiten la difusión de este ión a través de la membrana plasmática. Participan en la génesis del potencial de reposo y a través del mismo regulan el nivel de calcio intracelular y el estado de contracción del músculo liso vascular.

El ión K^+ se distribuye tanto en el líquido intracelular como en el extracelular, pero la cantidad absoluta es muy distinta en cada uno, siendo mucho mayor dentro de la célula que fuera de ella. Lo más importante en la génesis del potencial de membrana, a nivel del músculo liso vascular, es la salida de potasio, que tanto por su concentración como por el gradiente eléctrico, tiende a salir de la célula. El potencial de membrana del músculo liso vascular fluctúa entre -40 a -55 milivoltios (Nield y Keef, 1985). Mientras más tiempo estén abiertos los canales de K^+ o mayor cantidad de ellos estén abiertos, la salida de K^+ será mayor. En consecuencia, la membrana se hiperpolariza, los canales de calcio se cierran, el calcio intracelular disminuye y se produce relajación. A la inversa, cuando se cierran los canales de K^+ , hay despolarización, activación de canales de calcio, mayor entrada de calcio y contracción del músculo liso (Nelson y Quayle, 1995).

5.1 Tipos de canales de potasio

Existen distintos tipos de canales de K^+ en el músculo liso vascular: dependientes de voltaje, dependientes de calcio, de rectificación interna y los sensibles al ATP.

Los canales de potasio dependientes de voltaje o K_v , se componen de subunidades alfa y beta. Las subunidades alfa están formadas por una proteína con seis segmentos transmembrana, con el extremo amino y carboxi terminal intracelular, y un sensor de voltaje. Una subunidad alfa tiene seis segmentos que atraviesan la membrana y una subunidad beta, que habitualmente es intracelular. Con la unión de cuatro subunidades beta y cuatro subunidades alfa se forma el poro del canal funcional.

Estos canales se abren o cierran en relación con el potencial eléctrico de la membrana celular. Como inhibidores específicos de estos canales existen la 4-aminopiridina, la quinina e hipoxia).

Los canales dependientes de calcio intracelular tienen la misma disposición, pero en el segmento carboxi terminal pueden unir calcio. Hay canales de conductancia mayor, llamados Maxi K o BK, que son los más abundantes de todos los canales de K^+ en los vasos sanguíneos. Los activan el calcio intracelular y las proteínas quinasas A y G. Tienen inhibidores específicos (iberiotoxina, charibdotoxina y TEA). Hay, además,

canales regulados por calcio que permiten menor conductancia de K, llamados de “conductancia menor”.

Los canales rectificadores internos, en lugar de tener seis segmentos transmembrana, tienen solamente dos. También deben unirse cuatro subunidades alfa con cuatro subunidades beta para formar el canal funcional. Una subclase está constituida por el canal Kir (*inward rectifier*). Sus componentes principales son Kv 2.0 y quizás Kv 1.0. Son activados por hiperpolarización e inhibidos por bario y 4-aminopiridina y se postula que participan en la vasodilatación por hiperkalemia.

Los canales de K⁺ sensibles al ATP (K_{ATP}) son hetero-octámeros, compuestos de dos tipos de subunidades: las subunidades kir6.x (kir6.1 o kir6.2), que forman el poro, y las subunidades reguladoras, los receptores de sulfonilureas SUR (SUR1 o SUR2). Las subunidades kir6.x pertenecen a la familia de los canales de potasio *inward rectifier*. Las subunidades SUR pertenecen a la superfamilia de las proteínas *ATP-binding cassette*. Son dependientes de la relación [ATP]/[ADP] intracelular: cuando la concentración intracelular de ATP es superior a la concentración de ADP, el ATP intracelular inhibe estos canales uniéndose a las subunidades Kir6.x. Cuando disminuyen los niveles de ATP, estos canales se abren, la membrana se hiperpolariza, entra calcio y el vaso se dilata. Se ha demostrado que la glibenclamida, un bloqueador selectivo de los canales K ATP, produce constricción arteriolar en la microcirculación de diferentes especies, incluyendo a los humanos (Jackson y cols., 1993; Vanelli y cols., 1994).

VI. HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y TEJIDO ADIPOSO VISCERAL

La obesidad es la enfermedad metabólica más frecuente en el mundo occidental. Estudios epidemiológicos de países desarrollados demuestran que hasta un 45% de hombres y un 38% de mujeres presentan algún grado de obesidad.

La obesidad ha sido ampliamente reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de HTA. Los estudios realizados hasta el momento muestran que tanto el aumento de peso como el índice de masa corporal (IMC) elevado incrementan el riesgo de HTA (Aronne, 2002). Así, la frecuencia de aparición de hipertensión arterial entre las personas obesas es entre 2-3 veces mayor que entre las que se encuentren dentro de su

peso ideal. Esto también ocurre a la inversa, entre los hipertensos la frecuencia de obesos es mucho mayor.

El exceso de grasa corporal se distribuye en diferentes localizaciones anatómicas dependiendo de factores genéticos, hormonales y ambientales (Bouchard y cols., 1993). En las mujeres predomina el depósito en la zona gluteofemoral (obesidad ginecoide), mientras que en los varones es más frecuente encontrar el depósito en la región abdominal (obesidad abdominal o androide). Es precisamente este tipo de obesidad, abdominal, visceral, central, que se define por una circunferencia abdominal > 102 cm en los varones y > 88 cm en mujeres e $IMC > 30$ (Smith y cols., 2005), el factor de riesgo más importante de hipertensión y enfermedad cardiovascular (Sironi y cols., 2004).

Cuando se sobrepasa la capacidad de almacenamiento del tejido adiposo (TA) o se alteran los mecanismos que lo regulan, bien por condicionamiento genético o bien inducido por el propio cambio ambiental. La ingesta elevada de grasa además de la obesidad en sí misma, genera una situación metabólica desfavorable o tóxica que produce un aumento del flujo de ácidos grasos libres. El exceso de ácidos grasos libres, al no ser oxidados ni almacenados en TA subcutáneo, se acumulan de forma ectópica, en otros tejidos fundamentalmente, en hígado, músculo, corazón, endotelio y páncreas, produciendo diferentes grados de resistencia insulínica y síndrome metabólico, con el consiguiente incremento de morbimortalidad cardiovascular (Ravussin y Smith, 2002).

Es interesante destacar que la escasez o falta de TA, tanto en animales como en humanos, que caracteriza las lipodistrofias también se asocia con diversos componentes del síndrome metabólico (hiperinsulinismo y resistencia insulínica, diabetes y dislipemia), lo que sugiere la necesidad de tener una cantidad mínima de TA por debajo de la cual se desarrollaría esta patología (Ronti y cols., 2006).

La obesidad se asocia con un incremento del tamaño y del número de adipocitos, siendo la hiperplasia del TA un fenómeno irreversible. Pero el tipo de enfermedad que produce va a variar dependiendo del tipo de acúmulo de grasa que predomine: cuando el depósito de grasa se acumula preferentemente en el omento y el mesenterio se habla de obesidad visceral, y cuando el depósito se localiza principalmente a nivel subcutáneo se habla de obesidad subcutánea abdominal (Seidell y cols., 1990).

Como el TA visceral drena directamente al hígado a través de la circulación portal cuando existe un acúmulo de TA visceral frente al subcutáneo se produce un mayor flujo de ácidos grasos libres al hígado. Como consecuencia de ello, aumenta la producción y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y disminuye el aclaramiento hepático de la insulina, contribuyendo a la hiperinsulinemia y a la resistencia hepática a la insulina (Bouchard y cols., 1993; Bjorntorp, 1990). Por ello, el paciente obeso presenta resistencia insulínica, con aumento de ácidos grasos libres y reducción de la oxidación de los mismos, bajas concentraciones de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) e HTA. Esto se asocia a alteraciones en la producción o sensibilidad a la leptina, a niveles bajos de adiponectina y altos del factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6). Todos estos factores están implicados en la reducción de la sensibilidad a la insulina, con el consiguiente desarrollo de síndrome metabólico y aumento del riesgo cardiovascular (Casassus y cols., 1992; Williams y cols., 1997). Este mayor riesgo puede incluso afectar a individuos no obesos, pero con aumento de la grasa abdominal.

El TA es la principal reserva energética del organismo. Desempeña un importante papel manteniendo estable el aporte de energía, especialmente durante los períodos de ayuno, además de servir como aislante contra las pérdidas de calor y funcionar como soporte mecánico de ciertas regiones del cuerpo.

Además, es el único tejido del cuerpo que puede cambiar su tamaño al haber alcanzado la vida adulta, con capacidad de aumentar el volumen y el número de células, dependiendo de la necesidad de almacenar energía. Es un tejido muy vascularizado, al que llega una cantidad elevada de flujo sanguíneo, representando hasta un 7% del gasto cardiaco. En el caso de obesos mórbidos puede alcanzar hasta un 30%, lo que se relaciona con los problemas hemodinámicos típicos de la obesidad, como HTA, cardiomegalia e insuficiencia cardiaca. Presenta, asimismo, nódulos linfoides en cantidad variable, dependiendo de la zona, siendo muy abundantes en la grasa mesentérica. Estos influyen en la capacidad secretora del propio TA, induciendo la expresión de receptores de TNF- α en los adipocitos más próximos, estando implicados en funciones inmunológicas y en la respuesta inflamatoria. Está inervado por doble partida, sensorial y simpática. La inervación simpática esta íntimamente relacionada con fenómenos de lipólisis. De manera, que existe una relación inversa entre el grado de

inervación simpática y la proliferación y el crecimiento (hiperplasia) de los adipocitos. Así los adipocitos mesentéricos presentan una mayor inervación simpática que los del TA epididimal, y estos a su vez, mayor a los del TA retroperitoneal, y a su vez, que los del TA inguinal, siendo el tamaño de los adipocitos progresivamente mayor a medida que disminuye el grado de inervación. Así el tamaño de los adipocitos mesentéricos es menor que el de los adipocitos de otros tejidos adiposos. Además presentan una menor sensibilidad a la insulina y una sensibilidad lipolítica más elevada que las del TA subcutáneo (Lafontan, 2005; Hausman y cols., 2001). El efecto de las catecolaminas sobre el tejido adiposo dependerá del balance funcional entre sus receptores α y β , que puede ser modificado por la obesidad, ayuno, diabetes, hipertiroidismo, etc. Los receptores α_2 tienen acción antilipolítica, mientras que los β_1 , β_2 y β_3 son lipolíticos.

6.1 Tipos de tejido adiposo

Se distinguen dos grandes tipos de TA:

1. Tejido adiposo pardo o marrón, formado por adipocitos multilobulares con gran cantidad de mitocondrias que expresan cantidades elevadas de proteínas desacoplantes (UCPs), con una actividad primordialmente termogénica. Para optimizar el calentamiento corporal, el TA marrón se localiza estratégicamente en territorios superficiales y profundos. Los primeros son las regiones interescapular, cervical y axilar, mientras que los segundos corresponden a las regiones perirrenal, periaórtica, inguinal y especialmente alrededor del corazón y los grandes vasos. Esto permite calentar los órganos vitales por medio de la sangre que los irriga.

La estimulación adrenérgica en TA marrón tiene lugar vía receptores β_3 -adrenérgicos, con una cierta participación de los receptores adrenérgicos α -1. Estos receptores estimulan las UCPs que desacoplan el flujo de protones de la fosforilación oxidativa, produciendo calor en vez de ATP. Hasta la fecha se han identificado y clonado tres UCPs: UCP1, UCP2, e UCP3. La UCP1 y la UCP2 se expresan además en el TA blanco, mientras que la UCP3 se expresa principalmente en TA marrón y músculo esquelético. La leptina y las hormonas tiroideas estimulan la expresión de las tres isoformas, estimulando por tanto la termogénesis (Scarpace y cols., 1998).

2. Tejido adiposo blanco, está formado por adipocitos uniloculares, que contienen mitocondrias muy diferentes de aquellas encontradas en el tejido adiposo pardo. Es el más abundante del organismo, distribuido en tres áreas anatómicas – subcutánea (inguinal, dorso subcutáneo, axilar e interescapular), dérmica (formando una capa continua) e intraperitoneal (mesentérica, omental, perirrenal, retroperitoneal, epididímic y parametrial)–, cuya actividad principal es la de servir de reservorio energético, controlando la ingesta de energía y su distribución según las necesidades.

La función principal del TA blanco es almacenar triglicéridos, que provienen en su mayoría de los quilomicrones de la dieta y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) del hígado. La enzima clave es la lipoproteinlipasa, sintetizada en el propio adipocito, que hidroliza los triglicéridos convirtiéndolos en ácidos grasos libres que son captados por las mismas células, convirtiéndolos posteriormente en grasa.

Además de esta función de almacén energético, estudios de estos últimos años han puesto de manifiesto que este tejido actúa como un órgano endocrino que libera una gran variedad de sustancias, denominadas adipocitoquinas o adipoquinas en respuesta a estímulos extracelulares y cambios metabólicos, así como a factores locales. Estas adipocitoquinas son sintetizadas por los adipocitos, y también por el resto de componentes celulares de su matriz estromal, y pueden actuar localmente, de forma autocrina/paracrina, o sistémica, a través de efectos endocrinos.

Estos factores están fuertemente implicados en los procesos de homeostasis energética, actuando en tejidos diana, como el cerebro, hígado, célula β -pancreática o músculo esquelético, con la finalidad de adaptar el almacenaje de energía a las necesidades, modulando la ingesta, la secreción y acción de la insulina, el gasto energético, etc. Entre los factores secretados se encuentra la leptina, hormona que, actuando a través de receptores hipotalámicos, regula el apetito, el gasto energético y la respuesta neuroendocrina al ayuno, e interviene en funciones vitales, como la reproducción, la respuesta inmunológica, la hematopoyesis, la angiogénesis, la transcripción del gen de la insulina, la secreción de insulina y del metabolismo de los ácidos grasos libres. Otros factores liberados por el TA son hormonas sexuales y glucocorticoides, angiotensinógeno, adiposina y citoquinas proinflamatorias, como el TNF- α , potente inhibidor de la diferenciación del adipocito, que actúa aumentando la resistencia insulínica, la IL-6, el factor de crecimiento (TGF- β), el factor inhibidor de la activación del plasminógeno-1

(PAI-1) y la adiponectina, que actúa como un importante regulador de la sensibilidad a la insulina, encontrándose niveles disminuidos en obesos asociados a diabetes, resistina, etc.

Por lo tanto el TA blanco desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo energético, la función inmunitaria (factores del complemento, TNF- α), el remodelado vascular, la angiogénesis, la hematopoyesis, la osteogénesis, la función cardiovascular (angiotensinógeno, el PAI-1), la función metabólica (ácidos grasos, adiponectina, resistina), y la función neuroendocrina (leptina, hormonas sexuales, hormona del crecimiento) (Ahima y Flier., 2000; Shuldiner y cols., 2001; Frühbeck y cols., 2001; Kershaw y Flier., 2004; Ronti y cols., 2006)

Además, el adipocito, expresa, tanto en su membrana celular como nuclear, receptores para las hormonas del resto de ejes endocrinos (insulina, glucagón, hormona del crecimiento, colecistoquinina, hormonas tiroideas, hormonas sexuales y de Ang II), receptores para catecolaminas (receptores β_1 , β_2 , β_3 , α_1 y α_2 adrenérgicos, recibiendo, así, señales desde el sistema nervioso simpático), los PPAR- γ (receptores activados por el proliferador de peroxisomas) y receptores para citoquinas (leptina, TNF- α , IL-6) (Kershaw y Flier, 2004).

Es importante señalar que el contenido y distribución de la grasa adipocitaria, así como el tamaño de los adipocitos, determina diferencias sustanciales en el perfil de adipokinas circulantes, que influyen en el riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares. Son múltiples las implicaciones fisiopatológicas de las adipokinas, derivadas de su interrelación con el resto de los órganos.

Así, la adiponectina que ejerce múltiples efectos beneficiosos como la preservación de la función endotelial, la regulación del tono vascular, la mejora del perfil lipídico y evita la aterogénesis y el riesgo de rotura y desprendimiento de la placa de ateroma, el depósito ectópico de lípidos (Ouchi y cols., 2003). Paradójicamente, sus niveles disminuyen con la ganancia de peso (Arita y cols., 1999).

En situaciones de obesidad, existe una gran cantidad de adipokinas que dan lugar a la generación de un entorno inflamatorio crónico (TNF- α , IL-6, proteína C reactiva, etc) que contribuye a la disfunción endotelial, con la consiguiente pérdida de las características vasodilatadoras, antitrombóticas y antiaterogénicas de las células

endoteliales (Yudkin y cols., 1999). La resistina, la adiposina, el TNF- α , el PAI-1 además debido a su impacto sobre la sensibilidad a la insulina, el metabolismo del TA, el tono vascular y la progresión de la aterosclerosis pueden tener influencia en el desarrollo o agravamiento de la hipertensión relacionada con la obesidad (Sharma y cols., 2001).

La actividad de los péptidos natriuréticos está normalmente suprimida en los obesos (Maack, 1992). Por lo tanto, se observa una disminución de la acción de éstos, que habitualmente actúan regulando la resistencia vascular renal, aumentan la tasa de filtración glomerular, reducen la hipertonicidad de la médula renal interna e inhiben la reabsorción de sodio, inhibiendo la actividad del SRAA y disminuyendo la resistencia vascular sistémica. Además, en la hiperleptinemia crónica, típica de la obesidad se postula que existe una resistencia central a la acción de la leptina, es decir, sobre sus efectos a nivel de la ingesta y el gasto energético. Sin embargo, se preserva el incremento de la estimulación del sistema nervioso simpático a nivel de ciertos órganos como el riñón, el corazón, las glándulas suprarrenales y la vasculatura. Esto, junto con una retención anormal de sodio y deficiencia sistémica de óxido nítrico, es una situación que en conjunto puede contribuir al desarrollo de hipertensión en individuos obesos (Bravo y cols., 2006).

La Ang II, que también se genera por los adipocitos (Massiera y cols., 2001), favorece la hipertrofia de los adipocitos, como se verá en el capítulo III.

Por otra parte, el aumento en la producción de ácidos grasos libres (Stepniakowski y cols., 1995) aumentan la reactividad vascular mediada por los receptores α_1 -adrenérgicos; producen proliferación y migración de las células musculares lisas y disminuyen la vasodilatación mediada por el endotelio al inhibir la formación de NO. De esta forma, hipotéticamente, el TA puede producir aumento de la presión arterial al producir un aumento de la resistencia periférica.

Por lo tanto, determinadas alteraciones en el crecimiento, desarrollo y función del tejido adiposo pueden estar implicadas en el desarrollo de diversas patologías tales como la obesidad, la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, hipertensión y aterosclerosis.

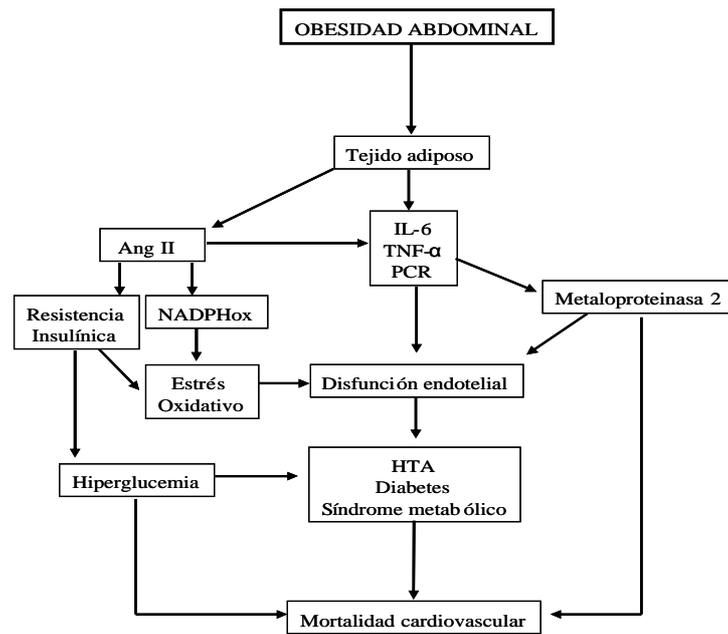


Figura 4: Mecanismo propuesto para el aumento de la HTA, el síndrome metabólico y la mortalidad cardiovascular debido a la obesidad abdominal. PCR: Proteína C reactiva; NADPHox: nicotinamida adenosin difosfato oxidado. Modificado de Lopez-Jaramillo y cols., 2005.

OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS GENERALES

El tejido adiposo actúa como un órgano endocrino que libera gran cantidad de adipocitoquinas que actúan de forma endocrina, paracrina y autocrina. Puesto que muchos de estos factores tienen efecto vasoactivo, el objetivo general de este trabajo es caracterizar el tejido adiposo perivascular y determinar su papel en la regulación de la función vascular en un modelo de hipertensión.

De este modo se han propuesto los siguientes objetivos que se agrupan en 3 capítulos (I-III):

- I. Caracterización del tejido adiposo perivascular y del papel del ADRF en la función vascular de WKY y SHR.
- II. Cuantificación de los niveles de leptina del tejido adiposo perivascular y caracterización de su efecto vascular.
- III. Caracterización del sistema renina-angiotensina del tejido adiposo perivascular.

CAPÍTULO I

Caracterización del tejido adiposo perivascular y del papel del ADRF en la función vascular de WKY y SHR

INTRODUCCIÓN

El estudio de la regulación del tono vascular se ha basado tradicionalmente en la caracterización de los mecanismos y factores que afectan a la estructura y a la función de las tres capas diferentes que constituyen los vasos sanguíneos: la íntima, la media y la adventicia.

Como se comentó anteriormente, el tejido adiposo además de su función como almacén de energía, actúa como un auténtico órgano secretor, con acciones autocrinas, paracrinas y sistémicas (Figura 5). Puesto que muchas de estas adipocitocinas tienen efectos sobre la función vascular (angiotensinógeno, adiponectina, leptina, TNF- α , IL-6, etc), y que muchos vasos sanguíneos están rodeados por una cantidad variable de tejido adiposo, en los últimos años se ha incrementado, el interés por el estudio del posible papel del tejido adiposo perivascular (periadventicial) en la regulación de la función vascular.

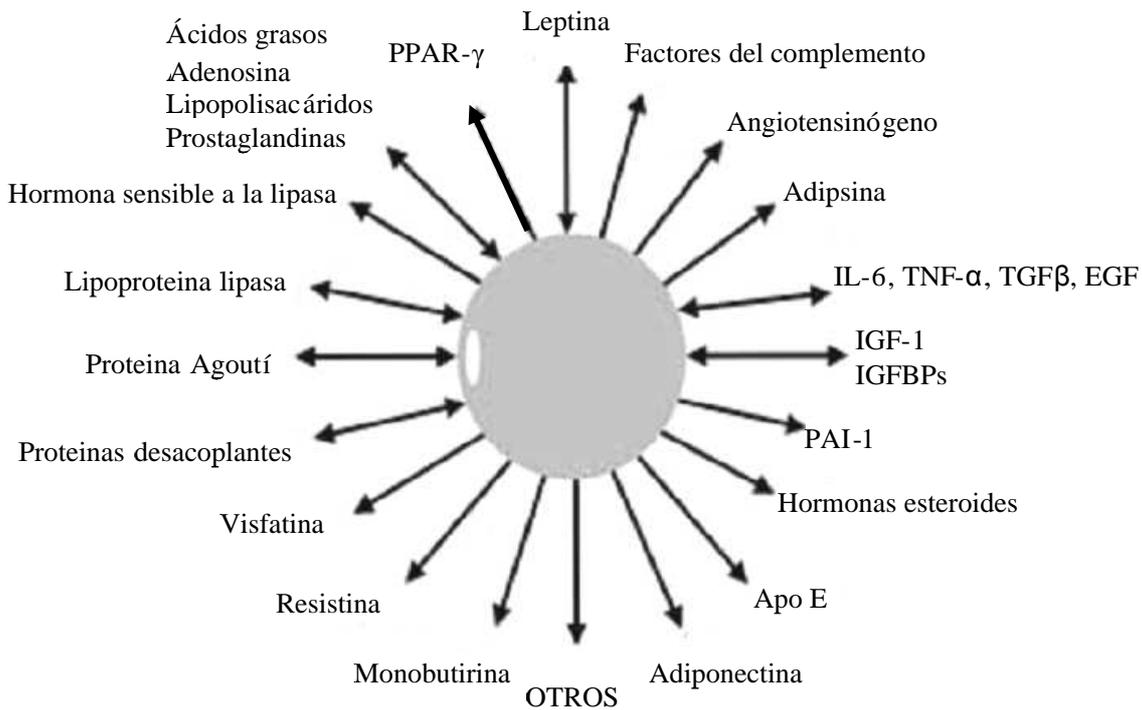


Figura 5: Ejemplo de algunas de las proteínas y factores secretados por los adipocitos. Algunos de estos factores actúan como hormonas endocrinas, como la IL-6, mientras que otras actúan de manera local, como el TNF- α y los factores de crecimiento. Estos factores están fuertemente implicados en los procesos de homeostasis energética, la reproducción, la inmunidad, la angiogénesis, la hematopoyesis, la inflamación, el metabolismo, etcétera. (TGF β : factor de crecimiento tumoral beta; EGF: factor de crecimiento endotelial; IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina; PAI-1: factor inhibidor de la activación del plasminógeno-1; PPAR- γ : receptores activados por proliferadores peroxisomales- γ). Modificado de Frühbeck y cols., 2001.

Soltis y Cassis demostraron, en 1991, que el tejido adiposo perivascular de ratas normotensas reducía las contracciones inducidas por la NA en segmentos de aorta. Posteriormente, Löhn y cols., confirmaron que el tejido adiposo periaórtico atenuaba las respuestas contráctiles inducidas por la fenilefrina, la 5-HT y la Ang II, concluyendo que este efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular estaba mediado por un factor difusible de naturaleza proteica, que se denominó factor relajante derivado de adipocitos (ADRF).

El ADRF se libera de los adipocitos perivasculares por un mecanismo que es dependiente de la concentración de calcio extracelular y su liberación está regulada por vías de señalización intracelulares en las que intervienen la tirosin quinasa (TK) o la protein quinasa A (PKA).

El efecto anticontráctil del ADRF no es dependiente de la presencia de endotelio, ni de la síntesis de NO. Su síntesis o acción tampoco depende de la vía de la COX o del citocromo P450, de la activación de receptores de adenosina, receptores de vainilloides/cannabinoides, receptores del péptido relacionado con el gen de la calcitonina o de la presencia de receptores funcionales de leptina (Gollasch y cols., 2004).

Este factor atenúa la acción de factores vasoconstrictores como la Ang II, la 5-HT, la fenilefrina, mediante un efecto relajante mediado por la activación, en la membrana plasmática de las células del músculo liso vascular, de canales de potasio.

En función del lecho vascular que se considere el efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular está mediado por distintos tipos de canales de potasio. Así, el ADRF actúa a través de canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) en las arterias mesentéricas (Verlohren y cols., 2004), ya que su efecto es inhibido en presencia de un bloqueante de canales Kv, como la 4-AP, o la 3,4- diaminopiridina. En la aorta actúa a través de canales de potasio dependientes de ATP (Löhn y cols., 2002), siendo su efecto inhibido en presencia de glibenclamida.

Además, el efecto anticontráctil del ADRF es proporcional a la cantidad de tejido adiposo perivascular. De hecho, el potencial de membrana de las células de músculo liso vascular está más hiperpolarizado en los segmentos arteriales intactos rodeados de grasa que en segmentos arteriales sin grasa. Tras la eliminación mecánica de la mitad del tejido adiposo perivascular, se produce una reducción de

aproximadamente el 50% del efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular (Verlohren y cols., 2004).

También, se postula que el tejido adiposo perivascular produzca varios ADRFs o existan diferentes receptores y segundos mensajeros del ADRF en los distintos lechos vasculares (Verlohren y cols., 2004).

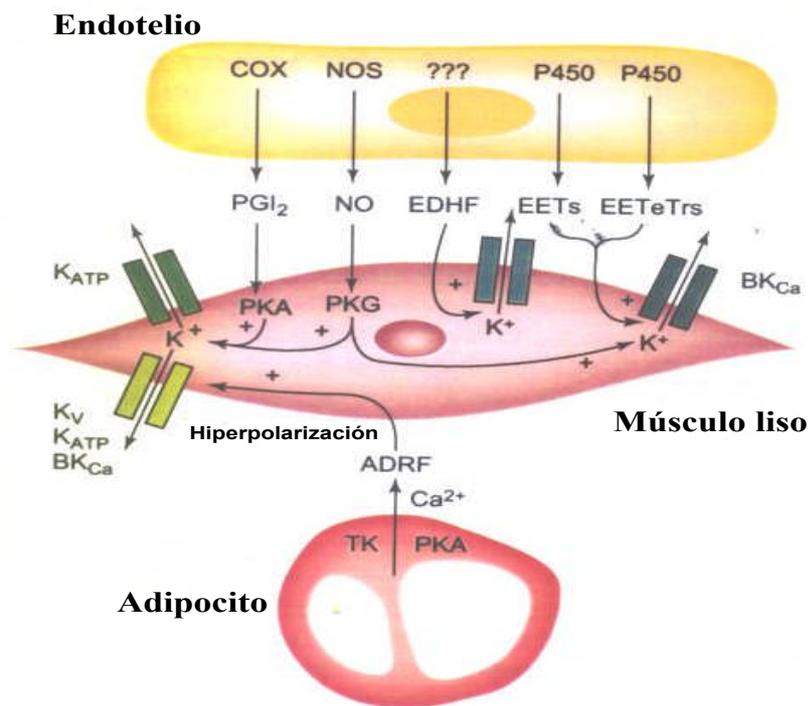


Figura 6: Regulación dual del tono arterial por el tejido adiposo perivascular y el endotelio. Las células endoteliales producen PGI₂ a través de la COX, NO a través de la eNOS, ácidos epoxieicosatrienicos (EET) y ácidos epoxieicosatetraenicos (EETeTr) a través de las enzimas del citocromo P450, y EDHF. La PGI₂ produce vasodilatación mediante la activación de la adenilato ciclasa y de la PKA, la cual provoca la apertura de canales de K⁺ dependiente de ATP (K_{ATP}), mientras que el NO activa la guanilato ciclasa y la PKG que produce la apertura de canales K_{ATP} y de canales de Ca²⁺ de larga conductancia activados por K⁺ (BK_{Ca}). Los adipocitos producen y liberan ADRF de una manera Ca²⁺ dependiente e implica la participación de múltiples moléculas de señalización intracelular, como son la PKA y la TK. El ADRF produce vasodilatación por apertura de canales K_V en las pequeñas arterias y por apertura de canales K_{ATP} y BK_{Ca} en las arterias de conducción. Modificado de Gollasch y cols., 2004.

Los resultados disponibles hasta el momento apoyan el concepto de la participación del tejido adiposo perivascular en la regulación del tono vasomotor y de la contractilidad arterial a través de la liberación de ADRF y de la activación de canales de potasio. Puesto que, la relevancia de estas observaciones en hipertensión es desconocida,

nuestro objetivo es analizar si el tejido adiposo perivascular contribuye al incremento de las resistencias vasculares en la hipertensión arterial y analizar la posible relación entre la cantidad y la función del tejido adiposo perivascular y la hipertensión arterial. Para ello, hemos empleado el sistema del lecho mesentérico perfundido. Este lecho vascular está rodeado de una gran cantidad, pero variable, de tejido adiposo blanco y los cambios en la cantidad de grasa perivascular podrían tener consecuencias en la regulación del tono arterial mesentérico y por consiguiente en la presión arterial sistémica.

OBJETIVOS CONCRETOS

El objetivo de este capítulo es caracterizar los animales de experimentación: ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar Kyoto (WKY) de 4 y 12 semanas de edad. Además, se estudiará el papel del tejido adiposo perivascular en la regulación del tono vascular mesentérico, así como el papel del ADRF en la regulación de la función vascular. Para ello se analizarán los siguientes aspectos:

1. Parámetros hemodinámicos: Frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica y diastólica.
2. Pesos de los animales y de los tejidos adiposos: periaórtico, mesentérico y lumbar.
3. Caracterización de los adipocitos mesentéricos de WKY y SHR a las 12 semanas de edad.
4. Bioquímica plasmática.
5. La reactividad vascular general del lecho vascular mesentérico.
6. El efecto anticontráctil del tejido adiposo mesentérico:
 - Papel de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv) sobre el efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular.
 - Relación entre el efecto anticontráctil del ADRF y la cantidad de tejido adiposo perivascular.
 - Efecto de la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje sobre el efecto anticontráctil del ADRF.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Caracterización de los animales de experimentación

1.1 Animales de experimentación y obtención de los tejidos adiposos

Se utilizaron ratas macho de las cepas SHR (rata espontáneamente hipertensa) y WKY (rata Wistar Kyoto, control normotenso), de 4 y 12 semanas de edad (Charles River, Barcelona, Spain). Los animales permanecieron estabulados en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), humedad (44-55%) y periodos de luz y oscuridad de 12h. Todos los animales recibieron una dieta sólida estándar (RMN, Harlan Interfauna Ibérica, España) y agua *ad limitum* hasta el momento de su utilización. La estabulación y utilización de los animales se realizó de acuerdo con la guía “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, publicado por el “US National Institute of Health” (NIH publicación número 85-23, revisado en 1996) y la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005).

Los animales se pesaron antes de comenzar el experimento. Puesto que la anestesia puede influir en la medida de los parámetros metabólicos y lipídicos del TA, los animales se sacrificaron por decapitación. Las muestras de sangre se recogieron en EDTA, y se congelaron a -80°C , en alícuotas hasta su uso en determinaciones bioquímicas. El TA mesentérico se separó rápidamente del intestino, se pesó en una balanza y se determinó su volumen en un pletismómetro. También se pesaron el TA lumbar y el TA periaórtico. Una parte de los TA mesentéricos se utilizó para el aislamiento y caracterización de los adipocitos del TA mesentérico.

1.2 Parámetros hemodinámicos de las cepas WKY y SHR

Los parámetros hemodinámicos: presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) y la frecuencia cardíaca (FC), se midieron de forma directa en ratas macho de 4 y 12 semanas de edad, anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.). Para ello se insertó en la arteria ilíaca derecha una cánula conectada a un transductor de presión (Statham, Harvard Aparatos GMBH, Alemania). La onda de presión arterial se registró en un ordenador PC, mediante el sistema de adquisición de datos con el programa Chart & Scope v5 PowerLab (ADI instruments) (Figura 7).

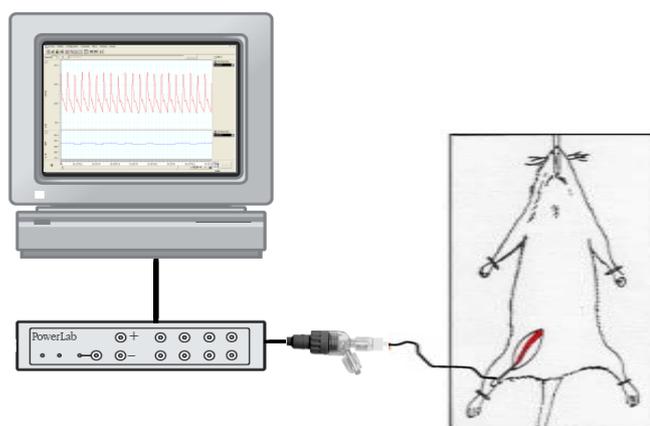


Figura 7: Esquema de la medida directa de la onda de presión arterial en la ratas anestesiada.

1.3 Extracción, medida y cuantificación del número de adipocitos del tejido adiposo mesentérico

Para la determinación del diámetro y número de adipocitos así como para la cuantificación del contenido lipídico de los mismos, el tejido adiposo mesentérico debe ser procesado en fresco. Para ello, una vez sacrificados los animales de 12 semanas de edad, el tejido adiposo mesentérico se separó cuidadosamente del intestino, se pesó y se introdujo en un frasco con suero salino (NaCl al 0,9%) atemperado previamente (37° C). Seguidamente se troceó finamente el tejido con unas tijeras sobre un papel Whatman N°1, previamente tarado y se pesó la cantidad de tejido. Para la digestión del tejido adiposo se empleó siempre material de plástico, ya que en el cristal los adipocitos se rompen. El tejido adiposo se incubó en un erlenmeyer que contenía una solución Krebs Ringer Bicarbonato (KRB), con albúmina al 4% (p:v), glucosa al 1% (p:v) y colagenasa A al 1% (p:v), en un baño de agua a 37° C durante 5 min con oxigenación y 25 min sin ella. Es importante tapar el erlenmeyer con papel de aluminio puesto que la colagenasa es fotosensible. A continuación se vertió el contenido del erlenmeyer en un tubo de plástico y se recogieron los adipocitos de la parte superior del tubo, con una punta de pipeta azul rota en el extremo, para filtrarlos a través de una tela a otro tubo de 15 ml. Una vez filtrados se enrasó el tubo hasta los 10 ml con el KRB y se centrifugó brevemente a 300 rpm, para poder separar así los adipocitos, que quedaron en la parte superior del tubo, de la colagenasa (infranadante). Se retiró el infranadante y con otra punta de pipeta azul cortada se volvieron a transvasar los adipocitos a otro tubo de 15 ml resuspendiéndolos en aproximadamente 5 ml de KRB por cada mililitro de adipocitos.

De la solución de adipocitos se retiraron unos microlitros con una pipeta pasteur de plástico, se añadieron unas gotas del colorante azul tripán y se colocaron sobre un porta para su observación al microscopio. Tras situar el cubre se confirmó a una magnificación de 10 aumentos que los adipocitos no estaban aplastados (aplastados presentarían forma elíptica). A continuación se midió su diámetro a 40 aumentos con el micrómetro del microscopio. Se realizaron aproximadamente 100 medidas en 5 ó 6 preparaciones diferentes de la misma muestra de adipocitos. El número de adipocitos se determinó a partir del volumen (en micras cúbicas) de los adipocitos: $\frac{\pi r^3}{3}$ (r: diámetro), que se multiplicó por la densidad del adipocito: $9,15 \times 10^{-4}$ ng/micras³ y se obtuvo el peso del adipocito en nanogramos. Después se dividió el peso de cada adipocito entre los nanogramos de lípido por ml de suspensión (ver apartado 1.4) y se obtuvo para cada adipocito un número de células por mililitro de suspensión. De la media de todos ellos se obtuvo el número de adipocitos en la suspensión.

1.4 Determinación del contenido lipídico de los adipocitos mesentéricos

En un frasquito de cristal se añadieron 500 μ l de la solución de adipocitos anterior, 1ml de una solución de propano/heptano (4:1), se agitó y posteriormente se añadió otro mililitro de heptano, se volvió a agitar y se dejó reposar.

Se produjeron dos fases, migrando la fracción lipídica a la fase orgánica/superior. De esta fase se recogieron 700 μ l y se trasvasaron a un vial de autoanalizador previamente tarado para dejar secar el disolvente y calcular por diferencia de pesada la cantidad de lípidos.

1.5 Determinaciones bioquímicas en plasma

1.5.1 Determinación de glucosa

La concentración de glucosa se midió mediante un método enzimático colorimétrico utilizando un kit (Unimate 7 GLUC PAP, Roche España) que es un sistema de diagnóstico in vitro para la determinación cuantitativa de glucosa en suero o en plasma. La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos, en forma de microensayo, utilizando 10 μ l de muestra en cada pocillo a los que se añadió 250 μ l del reactivo cuya composición se detalla a continuación:

- tampón fosfato 200 mM (pH 7,2)

- 4-ácido 4-hidroxibenzoico 10 mM
- 4-aminoantipirina 0,75 mM
- glucosa oxidasa (GOD) > 250 μ kat/L
- peroxidasa > 20 μ kat/L
- azida sódica 1% p/p <0,1%

Tras incubar la placa durante 10 min a 37° C, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Asys Hitech). La recta de calibración se preparó con una muestra estándar de una concentración de 131 mg/dl de glucosa, y otra muestra control cuya concentración oscila entre 74,6-91,2 mg /dl de glucosa.

1.5.2 Determinación de la insulina

La concentración de la insulina en plasma se determinó mediante un inmunoensayo enzimático utilizando un kit comercial (Rat insulin ELISA, Merckodia, Uppsala, Dinamarca), basado en la técnica directa tipo sandwich (ELISA). El porcentaje de variación intraensayo e interensayo fue del 1,8% y del 3,8%, respectivamente, en función de la concentración de insulina. El ensayo se hizo en una placa de 96 pocillos tapizados con el anticuerpo monoclonal anti-insulina de ratón. Se utilizaron 25 μ l de muestra, a los cuales se añadieron 50 μ l de una disolución de anticuerpo monoclonal anti-insulina conjugado con peroxidasa. Tras incubar durante 2 h a temperatura ambiente, la placa se lavó 6 veces con tampón de lavado. Posteriormente se añadieron 200 μ l de sustrato de peroxidasa (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina) y se incubó la placa durante 15 min a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 1 M. La placa se leyó a 450 nm en un lector de placas (Asys Hitech). La curva de calibración se preparó con las siguientes concentraciones de insulina: 0, 0,15, 0,40, 1, 3 y 5,5 μ g/ml.

1.5.3 Determinación de triglicéridos y de glicerol

La concentración de triglicéridos en plasma se determinó mediante un método enzimático colorimétrico utilizando un kit comercial (GPO-Trinder; Sigma-Aldrich, Madrid, España), mediante el cual los triglicéridos se hidrolizan por la lipoproteína lipasa a glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol generado se fosforila por el adenosin trifosfato (ATP), formando glicerol-1-fosfato (G-1-P) y adenosin-5'-difosfato (ADP) en

una reacción catalizada por la glicerol quinasa. El G-1-P se oxidada por la glicerol fosfato oxidasa a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno. Por último, la reacción del peróxido de hidrógeno con la 4-aminoantipirina y el N-etil-N-(3-sulfopropil)-anisidina sódica genera un producto coloreado cuyo máximo de absorbancia es a 540 nm. El incremento de la absorbancia a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos, en forma de microensayo, utilizando 10 µl de muestra en cada pocillo a los que se añadió 150 µl del reactivo cuya composición se detalla a continuación:

- ATP 0,375 mM
- 4-aminoantipirina 3,75 mM
- N-etil-N-(3-sulfopropil)m-anisidina sodica 2,11 mM
- glicerol cinasa 1250 U/L
- glicerol fosfato oxidasa 2500 U/L
- peroxidasa 2500 U/L
- tampón pH 7,0 ± 0,1
- lipasa 250 U/L
- azida sódica 0,05%

Tras incubar la placa durante 10 min a 37° C, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Asys Hitech). La recta de calibración se preparó con las siguientes concentraciones de una muestra estándar (calibrador): 156, 104, 52 y 0 mg/dl.

Mediante este mismo kit también se determinó la concentración de glicerol en las muestras de plasma. El reactivo utilizado es el mismo usado en la determinación de triglicéridos pero no contiene la lipoproteína lipasa, por lo que la secuencia de reacciones es la misma que la anteriormente descrita para el glicerol procedente de la hidrólisis de los triglicéridos, a excepción de la reacción lipolítica.

La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos, en forma de microensayo, utilizando 40 µl de muestra en cada pocillo a los que se añadieron 200 µL del reactivo.

Tras incubar la placa durante 5 min a 37°C, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Asys Hitech). La curva de calibración se preparó con las siguientes concentraciones de glicerol: 1000, 800, 750, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 μ M.

1.5.4 Determinación de ácidos grasos libres

La concentración de ácidos grasos libres se midió mediante un método enzimático colorimétrico utilizando un kit (NEFA C, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemania) que es un sistema de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de ácidos grasos no esterificados (o libres) en suero. La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos, en los que se añadieron 20 μ l de muestra y 100 μ l del reactivo A. Se incubó la placa durante 10 min y se añadieron 200 μ l del reactivo B. Tras incubar la placa durante otros 10 min, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Asys Hitech). La recta de calibración se preparó utilizando una muestra estándar de ácido oléico a las concentraciones de 0,03, 0,02, 0,01 mM.

La composición del reactivo A y del reactivo B es la que se detalla a continuación:

Reactivo A:

- acyl-coenzima A sintetasa 3 U
- ascorbato oxidasa 30 U
- coenzima A 7 mg
- adenosina trifosfato 30 mg
- 4-aminoantipirina 3 mg
- tampón fosfato pH 6,9
- cloruro magnésico 3 mM

Reactivo B:

- acyl-coenzima A oxidasa 132 U
- perosidasa 150 U
- 3-metil-N-etil-N(β -hidroxietil)-anilina 1,2 mM

1.5.5 Determinación del colesterol total

La concentración de colesterol total se determinó mediante un método enzimático colorimétrico utilizando un kit comercial de diagnóstico *in vitro*, para la determinación cuantitativa de colesterol total en suero o plasma (Menarini Diagnostics).

La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos, en forma de microensayo, utilizando 10 µl de muestra en cada pocillo a los que se añadieron 250 µl del reactivo. Tras incubar la placa durante 10 min a 37° C, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Asys Hitech).

1.6 Determinación de la actividad noradrenérgica en el tejido adiposo lumbar, de ratas WKY y SHR de 4 y 12 semanas de edad, mediante cromatografía líquida de alta resolución, HPLC

El metabolismo de la NA se produce por un mecanismo enzimático y por un mecanismo de recaptación de carácter neuronal y extraneuronal. Las dos enzimas que intervienen en la degradación son: la catecol-o-metiltransferasa (COM) y la MAO. Las catecolaminas periféricas siguen preferentemente la vía oxidativa para convertirse en el ácido 3,4-dihidroxi mandélico (DOMA) y, posteriormente en el ácido 3-metoxi-4-hidroxi mandélico (ácido vanilil mandélico).

La actividad noradrenérgica se estimó midiendo el cociente DOMA / NA. Puesto que el otro metabolito de la NA, el ácido 3-metoxi-4-hidroxi mandélico, fue indetectable en la mayoría de las muestras, aunque se detectó en las soluciones patrón. Para ello, una vez decapitados los animales se extrajo el tejido adiposo lumbar y se congeló a -80° C hasta su procesamiento.

El tejido adiposo lumbar (100 mg) se homogenizó en 500 µl de una solución tampón (0,1 M de fosfato-citrato (pH 2,5) conteniendo un 15% de metanol). Las muestras se sonicaron en tres sesiones consecutivas de 5 seg cada una a una potencia de 30 W (Sonics, Vibracell, Estados Unidos). Posteriormente, se centrifugaron a 14500 rpm durante 5 min. Se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante otros 5 min. Se extrajo el sobrenadante y se inyectaron 20 µl de cada muestra en un cromatógrafo (modelo Shimadzu SIL-10 A, refrigerado a 3°C) con un detector coulométrico electroquímico ESA Coulochem II, equipado con una precolumna y una columna C18 de Nucleosil (Scharlau) para la separación de las catecolaminas. La fase móvil utilizada consistió en una solución tampón de 4,5% de metanol (Symta), pH 2,75 con octil sulfato sódico (Sigma) 0.035% que contenía fosfato sódico dibásico 0,05 M, ácido cítrico 0,03 M y EDTA 0,1 mM (Sigma).

Para la medida del contenido en DOMA y NA de las muestras de tejido adiposo lumbar se compararon la altura de los picos de patrones conocidos con la altura de los picos correspondientes a las muestras según lo descrito por Chapin y cols. (1986) y Lindley y cols. (1990).

2. Papel del tejido adiposo perivascular en la regulación del tono vascular mesentérico

2.1 Obtención del lecho vascular mesentérico de rata

Para el estudio de la función vascular se utilizaron ratas WKY y SHR de 4 y 12 semanas de edad. Los animales se anestesiaron con éter en una cámara translúcida cerrada. De esta forma se evitó administrar un anestésico por vía intraperitoneal (i.p.) que pudiera modificar de alguna forma los experimentos. Posteriormente, se desangraron mediante punción cardiaca. Una vez expuesta la cavidad abdominal, se disecó la arteria mesentérica superior en su unión con la aorta abdominal. A continuación se canuló *in situ* la arteria mesentérica y se perfundió mediante una bomba peristáltica (Istmatec) a un flujo constante, durante todo el experimento, con una solución de Krebs-Henseleit modificada (KH) a 37° C y continuamente oxigenada (95% O₂ - 5% CO₂) para mantener de esta forma un pH fisiológico constante (7,3-7,4). Se eligió un flujo de 1,5 ml/min para los animales de 4 semanas de edad y un flujo de 2 ml/min para los animales de 12 semanas, que permite que el lecho mesentérico no se edematice y de las respuestas óptimas. Posteriormente, se separó con mucho cuidado el lecho vascular mesentérico del intestino delgado y se colocó en el baño de órganos.



Figura 8: Fotografía del lecho mesentérico de rata unido al intestino delgado.

2.2 Sistema de perfusión del lecho mesentérico de rata

El lecho vascular mesentérico, una vez canulado, con una cánula de acero inoxidable, y separado del intestino delgado, se colocó sobre una base de rejilla de acero inoxidable dentro de una cámara de metacrilato. Esta cámara posee un sistema de desagüe por donde se recoge la solución KH ya perfundida. Durante todo el tiempo del experimento, el lecho mesentérico se tapó con una gasa, empapada en solución KH, y parafilm para evitar la desecación y mantener la temperatura constante. El sistema de perfusión se conectó a un transductor de presión (Grass 79E), conectado a su vez a un polígrafo (Grass 79E), en el que se recogieron los cambios de presión del lecho vascular mesentérico (Figura 9).

Tras un periodo de estabilización de 45 min, se administró KCl (75 mM) para comprobar la funcionalidad del mesenterio. A continuación, se lavó durante unos 15 min el lecho vascular mesentérico perfundiéndolo exclusivamente con la solución KH. Posteriormente se realizaron las diferentes curvas concentración-respuesta a los distintos agentes vasodilatadores o vasoconstrictores.

En todos los experimentos realizados se añadió dexametaxona 8×10^{-7} M a la solución de KH para bloquear la inducción de la iNOS.

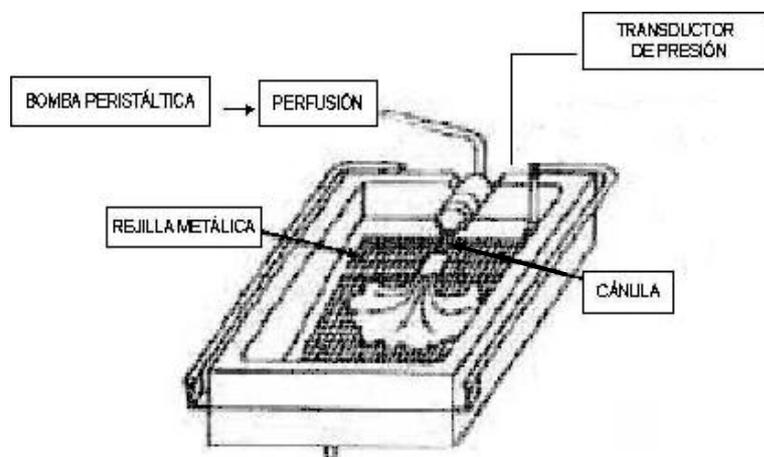


Figura 9: Perfusión del lecho vascular mesentérico "in vitro". El lecho vascular mesentérico canulado se colocó sobre una rejilla metálica en un sistema de perfusión conectado a una bomba peristáltica. Las soluciones utilizadas se encontraban en un baño a 37° C y continuamente oxigenadas. (Fotografía modificada de Organ perfusion and tissue baths. Research equipment for pharmacology and physiology. HSE).

3. Composición de las diferentes soluciones utilizadas

3.1 Composición del Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) pH= 7,35-7,45

La composición de esta solución expresada en mmoles/L fue la siguiente:

▪ NaCl	119
▪ KCl	4,7
▪ CaCl ₂ .2H ₂ O	6,5
▪ KH ₂ PO ₄	1,2
▪ MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
▪ NaHCO ₃	5,1

3.2 Composición de la solución Krebs-Henseleit modificada (KH)

La composición de esta solución expresada en mmoles/L fue la siguiente:

▪ NaCl	115
▪ KCl	4,6
▪ KH ₂ PO ₄	1,2
▪ MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2
▪ NaHCO ₃	25
▪ Cl ₂ Ca.2H ₂ O	2,5
▪ Na-EDTA	0,01
▪ Glucosa	11,1

La solución KH se preparó diariamente a partir de soluciones concentradas, excepto la glucosa que se añadió en la cantidad necesaria en el momento de la preparación.

3.3 Composición del salino-ascórbico

Esta solución fue utilizada para la preparación de soluciones madre y para las diluciones necesarias de éstas. Se añadió con el fin de retrasar la oxidación del grupo catecol. Su composición es la siguiente:

▪ NaCl	0,9%
▪ Ácido ascórbico	0,01% en agua destilada

Se conservó a una temperatura de entre 4-8° C.

3.4 Fármacos empleados y preparación de los mismos

- acetilcolina (Ach) (Sigma)
- 4-aminopiridina (4-AP) (Sigma)
- dexametasoma (Sigma)
- fenilefrina (Sigma)
- 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Sigma)
- N^G-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) (Sigma)
- nitroprusiato sódico (NPS) (Sigma)

Las disoluciones más concentradas (soluciones madre) de Ach, 4-AP, fenilefrina, 5-HT, L-NAME y NPS, se hicieron en salino ascórbico y se conservaron en alícuotas de 0,01 M, excepto para la acetilcolina que fue de 0,1 M. Para la dexametasona se prepararon soluciones madre en agua destilada y se conservaron en alícuotas de 500 µl. Todas las soluciones madre se almacenaron a -20° C hasta su utilización.

Para cada experimento se prepararon las diluciones necesarias de las soluciones madres con salino ascórbico y se mantuvieron en hielo el tiempo que duró el experimento.

Todos los fármacos utilizados se disolvieron en la solución KH, se mantuvieron en el baño a 37 ° C y estuvieron continuamente oxigenados.

4. Análisis estadístico

Los valores de los resultados obtenidos se expresaron mediante la media aritmética y el error estándar de la media aritmética (E.S). En todos los experimentos se indica el número de casos por grupo experimental.

En el análisis de las posibles diferencias entre distintos grupos experimentales se utilizó el programa estadístico StatView de Sas Institute Inc., versión 2002. Para comparar diferentes cepas y grupos de tratamiento las diferencias entre las medias se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de un postest (Fisher's). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Caracterización de las ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad

1.1 Medidas hemodinámicas

Los parámetros hemodinámicos: FC, PAS y PAD se determinaron de forma directa en ratas macho, anestesiadas con pentobarbital sódico. La cepa SHR a las 12 semanas de edad, ya presentó alteraciones hemodinámicas significativas, con elevación de la FC (WKY: $254,2 \pm 15$ latidos/min ; SHR: $319,8 \pm 9.7$ latidos/min, $p < 0,05$), de la PAS (WKY: 131 ± 4 mm Hg; SHR: 179 ± 8 mm Hg, $p < 0,05$) y de la PAD (WKY: 95 ± 6 mm Hg; SHR: 136 ± 6 mm Hg, $p < 0,05$), poniendo de manifiesto su carácter hipertenso a esta edad.

1.2 Pesos de los animales y de los tejidos adiposos

El peso de la rata a las 12 semanas de edad fue similar entre WKY y SHR. Sin embargo, la cepa SHR, presentó una menor cantidad de grasa perivascolar mesentérica. Ambos, peso y volumen del mesenterio corregidos por el peso del animal fueron significativamente menores en SHR que en WKY. Asimismo, la cantidad de tejido adiposo lumbar fue significativamente menor en SHR. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas, en la cantidad de tejido adiposo periaórtico entre ambas cepas (tabla 2).

	WKY 3 meses	SHR 3 meses
Peso rata (g)	316 ± 3	317 ± 6
Peso mesentérico (mg/g)	11 ± 0.3	$10 \pm 0.3^*$
Volumen mesenterio (l/g)	12 ± 1	$11 \pm 0.3^*$
Densidad mesentérico (g/l)	0.98 ± 0.01	0.96 ± 0.03
Tejido adiposo lumbar (mg/g)	8 ± 0.4	$5 \pm 0.5^*$
Tejido adiposo periaortico(mg/g)	0.7 ± 0.03	0.6 ± 0.04

Tabla 2: Peso del animal y del tejido adiposo mesentérico, lumbar y periaórtico expresado por el peso de rata, de ratas macho WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los datos representan la media \pm E.S de 25 determinaciones por animal. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

1.3 Medida y cuantificación de adipocitos mesentéricos

Para caracterizar si estas variaciones en la cantidad de tejido adiposo mesentérico, eran debidas a variaciones en los adipocitos y no en la fracción vascular, se cuantificó y se midió el diámetro de adipocitos mesentéricos de ratas SHR y WKY de 12 semanas de edad.

Como muestra la figura 10, la cepa SHR presentaba adipocitos mesentéricos significativamente más pequeños, con un diámetro de $26,9 \pm 4,3 \mu\text{m}$ frente a $36,9 \pm 3 \mu\text{m}$ de su control normotenso.

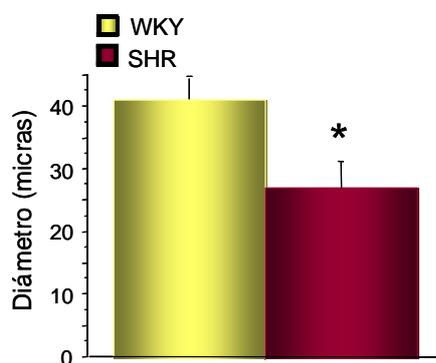


Figura 10: Diámetro de adipocitos mesentéricos de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados como la media \pm E.S de 100 determinaciones por animal. Se utilizaron 6 animales/grupo. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

La distribución del tamaño de los adipocitos está ligeramente desplazada a la izquierda en la cepa SHR confirmando, que los adipocitos, en esta cepa, son más pequeños (figura 11).

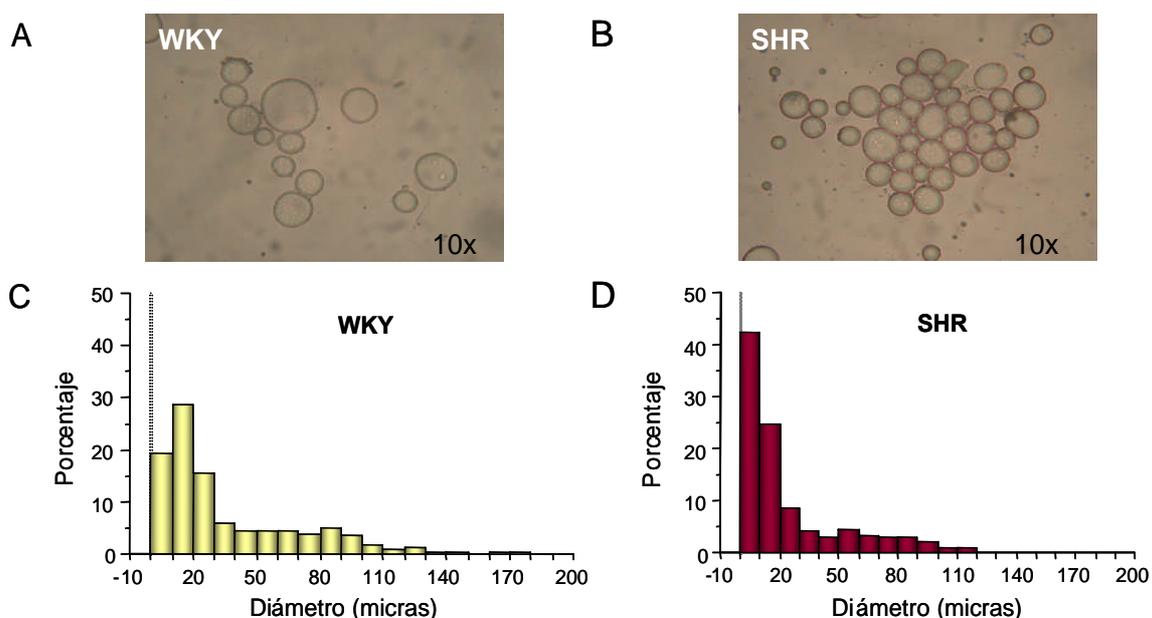


Figura 11: Fotografía de adipocitos aislados de tejido adiposo mesentérico fresco, (A) WKY y (B) SHR. Amplificación 10x. (C) Distribución del tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo mesentérico de WKY y (D) SHR. Los resultados están expresados como la media \pm E.S de 100 determinaciones por animal. N= 6 animales/grupo.

Además, el contenido de lípidos totales del tejido adiposo mesentérico es también significativamente menor en la cepa SHR (43 ± 8 g lípidos/100 g tejido) comparado con WKY (69 ± 8 g lípidos/100 g tejido; $p < 0,05$). Estos resultados indican que la cepa SHR presenta una menor cantidad de tejido adiposo perivascular, con adipocitos más pequeños y que poseen un menor contenido lipídico, que su control normotenso.

Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de adipocitos entre ambas cepas (figura 12).

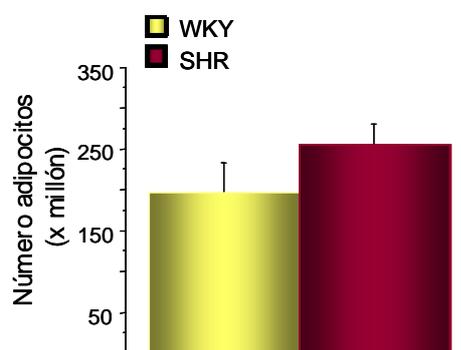


Figura 12: Número de adipocitos mesentéricos de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados como la media \pm E.S de 100 determinaciones por animal. $n = 6$ animales/grupo.

1.4 Determinaciones bioquímicas plasmáticas

A la edad de 12 semanas, el análisis de los parámetros lipídicos plasmáticos indica que la cepa SHR presenta unos niveles circulantes de triglicéridos, glicerol, ácidos grasos libres y colesterol total significativamente menores a los de la cepa WKY (tabla 3). Además, los niveles de insulina fueron significativamente menores en SHR, pero sin embargo, los niveles plasmáticos de glucosa fueron similares entre las cepas.

	WKY 3 meses	SHR 3 meses
Triglicéridos (mg/dl)	$145,1 \pm 12$	$94 \pm 5^{**}$
Glicerol (μ M)	264 ± 17	$203 \pm 19^*$
Ácidos grasos libres (μ M)	$621,7 \pm 91,2$	$309,2 \pm 27,2^{**}$
Colesterol total (mg/dl)	$65,3 \pm 3,1$	$53 \pm 0,8^{**}$
Insulina (μ g/l)	$2,6 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,4^*$
Glucosa (mg/dl)	$136 \pm 4,7$	$130 \pm 5,8$

Tabla 3: Determinaciones bioquímicas plasmáticas en ratas macho WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los datos representan la media \pm E.S de 6 determinaciones por animal. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$.

1.5 Determinación de la actividad noradrenérgica en el tejido adiposo lumbar de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad mediante HPLC

Para determinar si las modificaciones en la cantidad de tejido adiposo en la cepa SHR se deben a una hiperreactividad simpática se determinó la actividad noradrenérgica por HPLC en el tejido adiposo lumbar de WKY y SHR de 12 semanas de edad. El tiempo de retención del metabolito de la noradrenalina, el DOMA, fue de 4,03 min y el de la NA de 6,6 min. Dicha actividad se expresó como el cociente entre el DOMA y la NA, la cual fue similar entre ambas cepas (figura 13). Indicando que la actividad simpática en la cepa SHR a las 12 semanas de edad no está incrementada con respecto a su control normotenso, WKY.

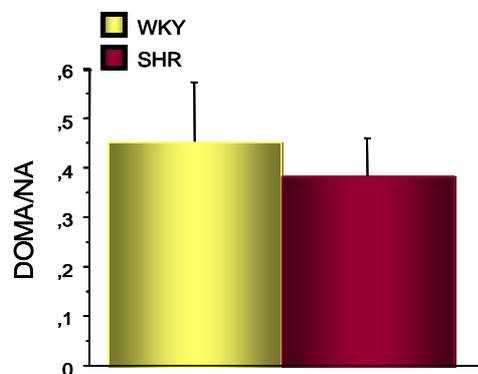


Figura 13: Actividad noradrenérgica en el tejido adiposo lumbar de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados como la relación entre el DOMA y la NA de n= 5-6 determinaciones/ cepa.

2. Reactividad vascular general del lecho mesentérico de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad

2.1 Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico a KCl

La presión basal de perfusión del lecho vascular mesentérico al flujo de 2 mL/min fue similar en ambas cepas (WKY=6,9 ± 0,6 mm Hg; SHR=7,1 ± 0,6 mm Hg).

Para comprobar la funcionalidad del lecho mesentérico tras su canulación, se administró KCl 75 mM. El KCl 75 mM produjo un aumento de la presión basal de perfusión que no fue diferente estadísticamente entre ambas cepas (Figura 14).

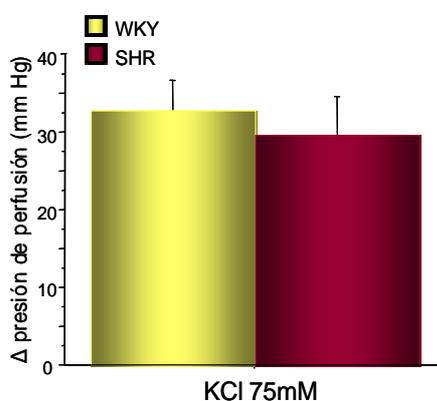


Figura 14: Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad a KCl 75 mM. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media ± E.S de n = 15 determinaciones/cepa.

2.2 Respuesta contráctil a fenilefrina 10⁻⁵ M

La fenilefrina, un agonista de los receptores α_1 -adrenérgicos, produjo un aumento estable de la presión de perfusión del lecho mesentérico, que fue significativamente mayor en la cepa SHR comparado con WKY (figura 15).

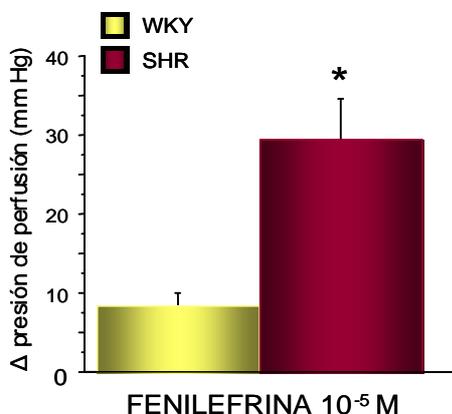


Figura 15: Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad a fenilefrina 10⁻⁵ M. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media ± E.S de n = 15 animales/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control p < 0,05.

2.3 Liberación basal de óxido nítrico

Con el fin de estudiar la liberación basal del NO y su contribución en el mantenimiento del tono vascular mesentérico, se preincubó el lecho mesentérico, durante 20 minutos, con un inhibidor no selectivo de la NOS, el L-NAME a una dosis de 10^{-4} M. El L-NAME produjo un aumento similar de la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico, en WKY y en SHR, indicando que la liberación basal de NO es similar en ambas cepas (figura 16).

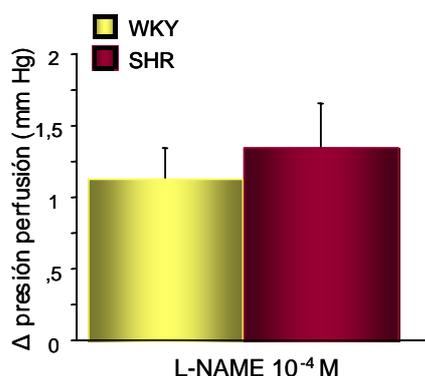


Figura 16: Efecto del L-NAME 10^{-4} M sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de n= 10-13 determinaciones/cepa.

2.4 Respuesta relajante dependiente de endotelio. Respuesta a acetilcolina

Para analizar la relajación dependiente de endotelio se analizó la respuesta a la Ach (10^{-9} – 10^{-5} M) de las arterias mesentéricas precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M.

La curva de relajación a Ach fue similar entre ambas cepas, siendo la relajación de aproximadamente un 80-85% del tono previo, en ambas cepas (Figura 17), indicando que la relajación dependiente de endotelio fue similar en WKY y SHR.

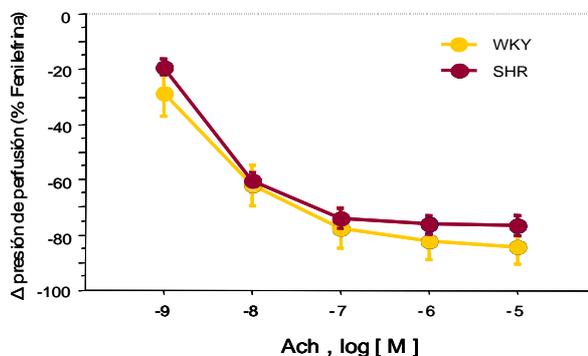


Figura 17: Respuesta relajante a acetilcolina (Ach) del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad, precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M. La relajación dependiente de endotelio fue similar en ambas cepas. Los resultados están expresados como relajación en porcentaje de la contracción a fenilefrina 10^{-5} M. Cada resultado representa la media \pm E.S de n=16-12 determinaciones/cepa.

2.5 Efecto de la inhibición de la NOS sobre la respuesta a acetilcolina

A pesar de que la respuesta relajante dependiente de endotelio en las arterias mesentéricas es dependiente principalmente del EDHF, se analizó la posible contribución del NO, en la relajación mediada por la acetilcolina. Para ello se determinó el efecto del L-NAME 10^{-4} M, un inhibidor no selectivo de la NOS, en la respuesta a la Ach (10^{-9} – 10^{-5} M) de las arterias mesentéricas precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M. En estas condiciones, la Ach indujo una respuesta relajante similar en ambas cepas y de aproximadamente el 100% del tono previo, (Figura 18), lo que sugiere que la contribución del NO en la respuesta vasodilatadora inducida por la Ach en las arterias mesentéricas es escasa e igual en ambas cepas.

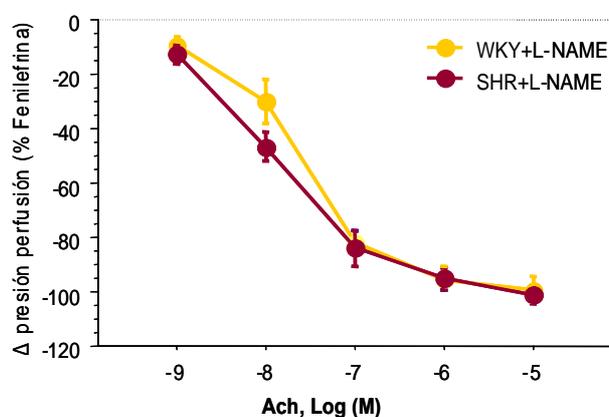


Figura 18: Respuesta relajante a acetilcolina (Ach) del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad, precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M en presencia de L-NAME 10^{-4} M. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en porcentaje de la contracción a fenilefrina 10^{-5} M. Cada resultado representa la media \pm E.S de n=12-16 determinaciones/cepa.

2.6 Respuesta relajante independiente de endotelio. Respuesta a nitroprusiato sódico

Para analizar la capacidad relajante del músculo liso vascular, independiente de endotelio, se realizó una curva de concentración-respuesta a NPS (10^{-12} a 10^{-5} M) en las arterias mesentéricas precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M.

En ambas cepas el NPS, indujo una vasodilatación dependiente de la concentración. A las dosis más pequeñas de 10^{-11} y 10^{-10} M, la respuesta al NPS fue significativamente menor en la cepa SHR. Sin embargo, a dosis más elevadas, de 10^{-9} a 10^{-5} M, la respuesta al NPS fue similar en ambas cepas. Esto sugiere que la respuesta relajante independiente de endotelio es similar en WKY y SHR, por lo que la

sensibilidad de la guanilato ciclasa o la capacidad del músculo liso vascular para contraer y relajar es similar en ambas cepas (figura 19).

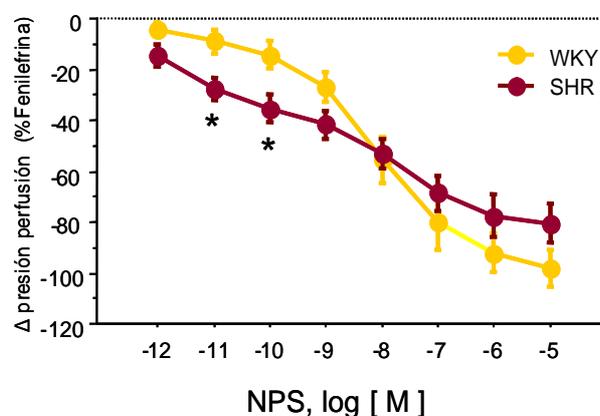


Figura 19: Respuesta relajante a NPS del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad, precontractadas con fenilefrina 10^{-5} M. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en porcentaje de la contracción a fenilefrina 10^{-5} M. Cada resultado representa la media \pm E.S de n = 7-8 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

3. Estudio del efecto anti-contráctil de la grasa perivascular mesentérica de WKY y SHR de 12 semanas de edad

3.1 Papel de los canales de potasio dependientes de voltaje sobre el efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular

Para confirmar la participación de los canales Kv en el efecto anticontráctil mediado por el ADRF, analizamos la respuesta del lecho vascular mesentérico a la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje (Kv). Para ello, incubamos el lecho vascular mesentérico, durante 20 min, con el bloqueante de estos canales, la 4-AP, a una dosis de 2×10^{-3} M.

La 4-AP, 2×10^{-3} M, produjo un aumento de la presión de perfusión del lecho mesentérico que fue significativamente menor en SHR. (WKY: $6,143 \pm 1,036$ y SHR: $2,128 \pm 0,325$; $p < 0,05$) (Figura 20). Esto sugiere que la liberación basal de ADRF es significativamente menor en SHR.

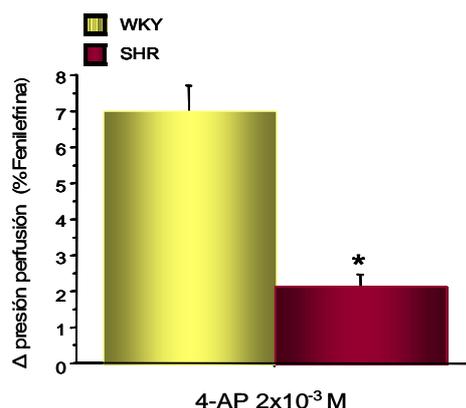


Figura 20: Efecto 4-AP 2×10^{-3} M de la sobre la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n= 10-13$ determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

3.2 Relación entre el efecto anticontractil del ADRF y la cantidad de tejido adiposo perivascular

Puesto que el efecto anticontractil del ADRF es dependiente de la cantidad de tejido adiposo perivascular, se analizó la relación entre la respuesta a la 4-AP y la cantidad de tejido adiposo perivascular. Se encontró, que existía una correlación positiva entre la respuesta contráctil inducida por la 4-AP y la cantidad de tejido adiposo mesentérico (figura 21), es decir, en la cepa SHR la respuesta contráctil inducida por la 4-AP es significativamente menor que en WKY, por presentar una menor cantidad de tejido adiposo mesentérico.

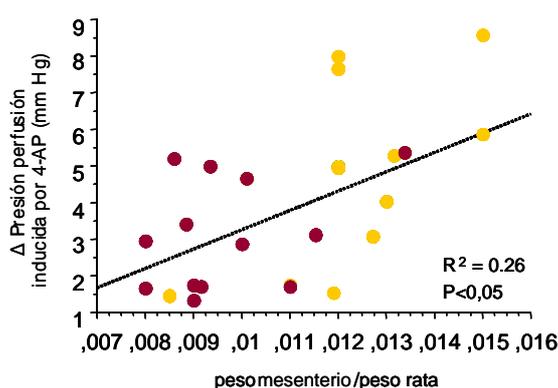


Figura 21: Correlación entre respuesta contráctil inducida por la 4-AP y la cantidad de tejido adiposo mesentérico. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n= 10-13$ determinaciones/cepa.

3.3 Efecto de la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje sobre la respuesta del lecho vascular mesentérico a serotonina

Para determinar si las diferencias observadas entre WKY y SHR en la cantidad de tejido adiposo mesentérico pueden influir en la regulación de la función vascular del

lecho mesentérico, realizamos una curva concentración-respuesta a 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M), en ausencia (Figura 22) y en presencia de la 4-AP (2×10^{-3} M) (Figura 23).

La siguiente figura muestra la respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico a distintas concentraciones de 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M) en ausencia de 4-AP. En la cepa SHR la vasoconstricción inducida por la 5-HT, a las concentraciones más altas (10^{-6} - 10^{-5} M), fue significativamente mayor que en WKY.

En la cepa WKY la 4-AP produjo un incremento de la respuesta contráctil a 5-HT, que fue estadísticamente significativo a la dosis de 10^{-5} M (Figura 23A), indicando que en la cepa WKY, a la edad de 12 semanas, existe un efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular mesentérico, que no existe en la cepa SHR (Figura 23B).

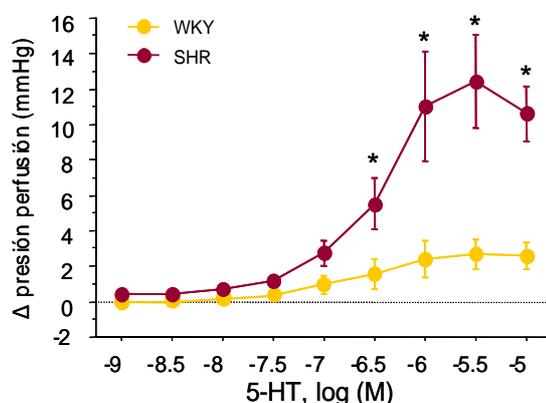


Figura 22: Curva concentración-respuesta de 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M) en el lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n=9$ determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

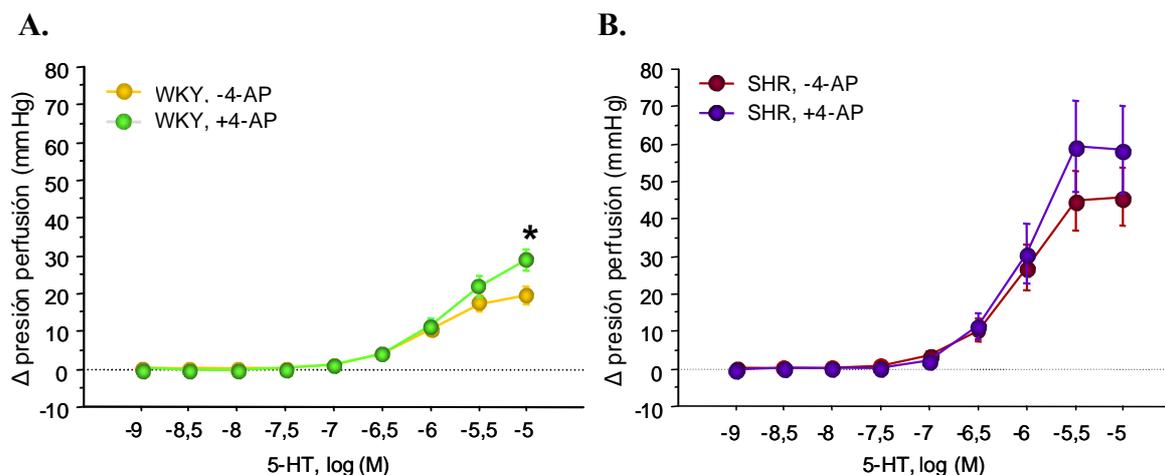


Figura 23: Curva concentración-respuesta de 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M) en el lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 12 semanas de edad, en presencia y en ausencia de 4-AP (2×10^{-3} M), WKY (A) y SHR (B). Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n=6$ determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

4. Caracterización de las ratas WKY y SHR de 4 semanas de edad

Con el fin de estudiar si estas alteraciones en la cantidad de tejido adiposo perivascular eran o no una consecuencia de la hipertensión arterial, se determinó la cantidad de tejido adiposo mesentérico, lumbar y periaórtico, en ratas macho de 4 semanas de edad.

4.1 Medidas hemodinámicas

A la edad de 4 semanas no se encontraron diferencias significativas en la PAS entre WKY y SHR (WKY: $88,7 \pm 4,7$ mm Hg; SHR: $99,8 \pm 3,9$ mm Hg). Aunque, la cepa SHR presenta unos niveles de PAD y FC significativamente superiores que WKY (WKY: 49 ± 5 mm Hg; SHR: $65,5 \pm 3,7$ mm Hg; WKY: 249 ± 17 latidos/min; SHR: 303 ± 12 latidos/min). Confirmando que a esta edad la hipertensión no está todavía establecida en la cepa SHR, siendo por tanto, a esta edad, ratas prehipertensas.

4.2 Pesos de los animales y de los tejidos adiposos

A esta edad, tampoco se encontraron diferencias en el peso del animal entre WKY y SHR, pero la cepa SHR ya presentaba alteraciones estadísticamente significativas en la cantidad de tejido adiposo mesentérico y lumbar, al igual que ocurría a la edad de tres meses, cuando la hipertensión arterial ya está establecida (tabla 4).

	WKY 1 mes	SHR 1 mes
Peso rata (g)	68 ± 3	62 ± 2
Peso mesenterio (mg/g)	$9 \pm 0,3$	$8 \pm 0,3^*$
Volumen mesenterio (l/g)	$10 \pm 0,4$	$8 \pm 0,4^*$
Densidad mesenterio (g/l)	$0,95 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,05$
Tejido adiposo lumbar (mg/g)	$2 \pm 0,3$	$1 \pm 0,2^*$
Tejido adiposo periaórtico (mg/g)	$0,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,04$

Tabla 4: Peso del animal y del tejido adiposo mesentérico, lumbar y periaórtico expresado por el peso de rata, de ratas macho WKY y SHR de 4 semanas de edad. Los datos representan la media \pm E.S de 17 determinaciones por animal. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

4.3 Parámetros bioquímicos plasmáticos

Los niveles plasmáticos de triglicéridos, glicerol, colesterol total y glucosa fueron similares entre WKY y SHR a la edad de 4 semanas (tabla 5).

	WKY 1 mes	SHR 1 mes
Triglicéridos (mg/dl)	43 ± 5	51 ± 4,6
Glicerol (µM)	194 ± 21,6	195 ± 14,3
Colesterol total (mg/dl)	53 ± 5,5	56 ± 4
Glucosa (mg/dl)	143 ± 5,8	139 ± 9,6

Tabla 5: Bioquímica plasmática de ratas macho WKY y SHR de 4 semanas de edad. Los datos representan la media ± E.S de 6 determinaciones por animal.

4.4 Determinación de la actividad noradrenérgica en el tejido adiposo lumbar de ratas WKY y SHR de 4 semanas de edad mediante HPLC

La actividad noradrenérgica se determinó también en el tejido adiposo lumbar de WKY y SHR de 4 semanas de edad. El tiempo de retención del DOMA, fue de 4,02 min y el de la NA de 6,3 min. Dicha actividad se expresó como el cociente entre el DOMA y la NA, la cual fue similar entre ambas cepas (Figura 24). Indicando que la actividad simpática en la cepa SHR a las 4 semanas de edad no está incrementada con respecto a su control normotenso, WKY.

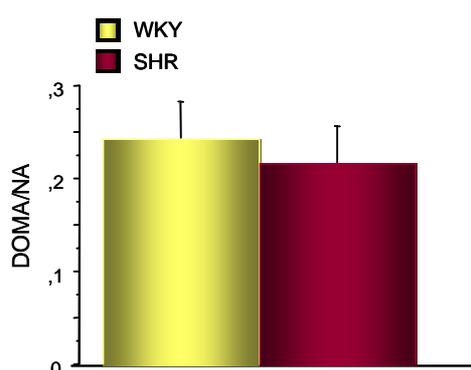


Figura 24: Actividad noradrenérgica en el tejido adiposo lumbar de WKY y SHR de 4 semanas de edad. Los resultados están expresados como la relación entre el DOMA y la NA de n= 5-6 determinaciones/ cepa.

5. Reactividad vascular general del lecho mesentérico de ratas WKY y SHR de 4 semanas de edad

Puesto que las alteraciones en la cantidad y función del tejido adiposo mesentérico pueden contribuir al incremento de las resistencias vasculares periféricas en la hipertensión, nuestro siguiente propósito fue determinar si las alteraciones encontradas en SHR en el efecto anticontráctil del tejido adiposo perivascular eran previas o posteriores al desarrollo de la hipertensión.

5.1 Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico a KCl

La presión basal de perfusión del lecho vascular mesentérico al flujo de 1,5 mL/min fue similar en ambas cepas (WKY= $6,4 \pm 1$ mm Hg; SHR= $8,7 \pm 1,1$ mm Hg).

Atendiendo inicialmente a la reactividad vascular del lecho mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad, se encontró que la respuesta inducida por KCl (75 mM) fue similar en ambas cepas (Figura 25A), al igual que ocurrió con la curva de KCl (6-75 mM) (Figura 25B), lo que indica, que la capacidad de hiperpolarización de las células del músculo liso vascular es similar en ambas cepas.

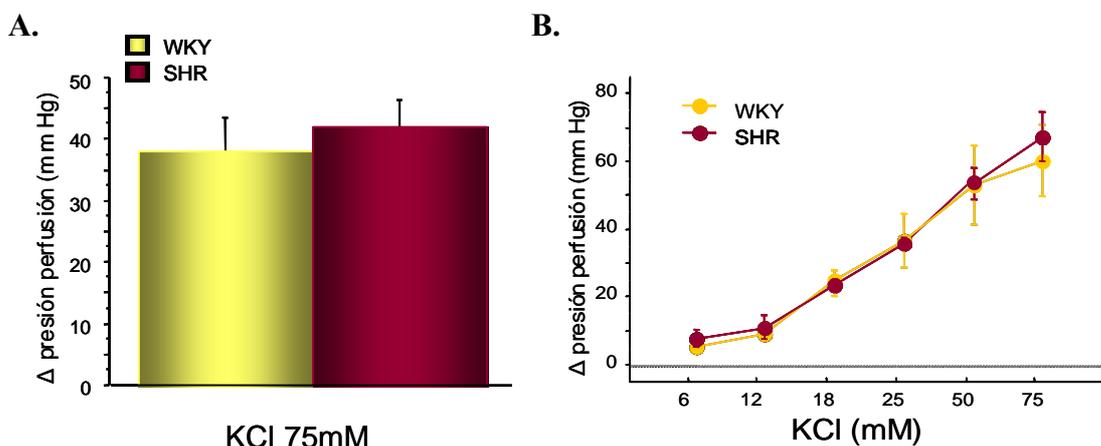


Figura 25: (A) Respuesta contráctil a KCl 75 mM y (B) Curva concentración-respuesta de KCl (6-75 mM) en el lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de n= 5-8 determinaciones/cepa.

5.2 Respuesta contráctil a prostaglandina $F_{2\alpha}$ y serotonina 10^{-5} M

El incremento de la presión de perfusión inducido por la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 10^{-5} M (Figura 26A) y la 5-HT 10^{-5} M (Figura 26B), a la edad de 4 semanas,

fue significativamente mayor en la cepa SHR, comparado con WKY, como sucedía con la fenilefrina 10^{-5} M en las ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad.

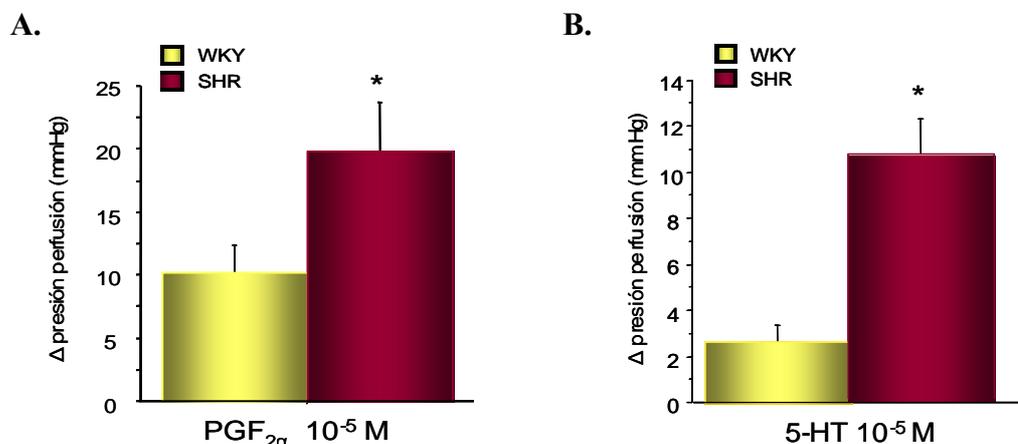


Figura 26: Respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad a $PGF_{2\alpha} 10^{-5} M$ (A) y $5-HT 10^{-5} M$ (B). Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n=7$ determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

5.3 Respuesta relajante dependiente de endotelio. Respuesta a acetilcolina

Para analizar la relajación dependiente de endotelio se analizó la respuesta a la Ach (10^{-9} – 10^{-5} M) de lecho vascular mesentérico precontraído con fenilefrina 10^{-5} M.

Al igual que en las ratas WKY y SHR, de 12 semanas de edad, la respuesta a Ach fue dependiente de la concentración e indujo una respuesta relajante similar en ambas cepas (Figura 27), indicando que la relajación dependiente de endotelio en SHR es similar a la de WKY.

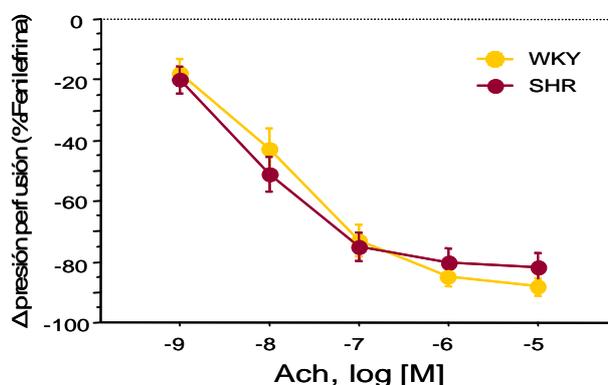


Figura 27: Respuesta relajante a acetilcolina (Ach) del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad, precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M. La relajación dependiente de endotelio fue similar en ambas cepas. Los resultados están expresados como relajación en porcentaje de la contracción a fenilefrina 10^{-5} M. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n=16-12$ determinaciones/cepa.

5.4 Efecto de la inhibición de la NOS sobre la respuesta a acetilcolina

Para determinar la contribución del NO en la respuesta relajante mediada por la Ach, se analizó, al igual que en las ratas de 12 semanas de edad, el efecto del inhibidor inespecífico de la NOS, el L-NAME 10^{-4} M, en la respuesta a la Ach (10^{-9} – 10^{-5} M) de las arterias mesentéricas de WKY y SHR de 4 semanas de edad, precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M.

La respuesta del lecho vascular mesentérico a acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en presencia de L-NAME 10^{-4} M fue también similar en WKY y SHR de 4 semanas de edad. Indicando nuevamente, que la contribución del NO en la respuesta del lecho vascular mesentérico a la Ach es similar en ambas cepas (Figura 28).

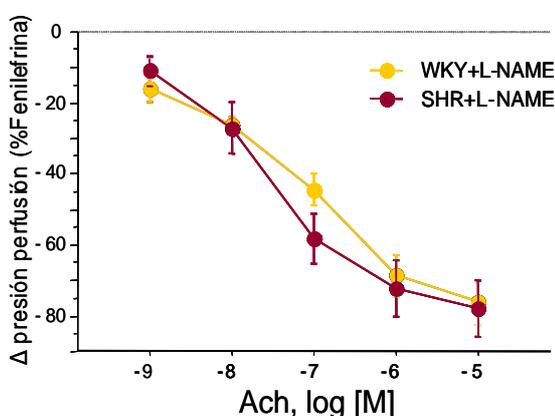


Figura 28: Respuesta relajante a acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad, precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M en presencia de L-NAME 10^{-4} M. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de n=5 determinaciones/cepa.

5.5 Respuesta relajante independiente de endotelio. Respuesta a nitroprusiato sódico

La relajación independiente de endotelio, analizada como respuesta a NPS (10^{-9} - 10^{-5} M), fue también similar en ambas cepas a la edad de 4 semanas (Figura 29), por lo que la capacidad vasodilatadora del músculo liso vascular, independiente de endotelio, es similar en WKY y SHR.

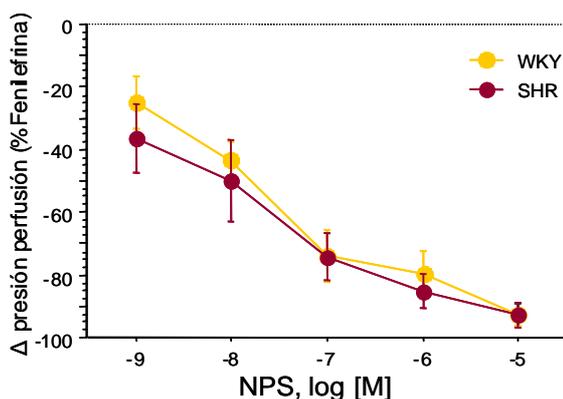


Figura 29: Respuesta relajante a NPS (10^{-9} - 10^{-5} M) del lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad precontraídas con fenilefrina 10^{-5} M. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en porcentaje de la contracción a fenilefrina 10^{-5} M. Cada resultado representa la media \pm E.S de n = 5 determinaciones/cepa.

6. Estudio del efecto anti-contráctil de la grasa perivascular mesentérica de WKY y SHR de 4 semanas de edad

6.1 Efecto de la inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje sobre la respuesta del lecho vascular mesentérico a serotonina

Para el estudio del efecto anticontráctil de la grasa perivascular mesentérica en ratas prehipertensas, se realizó una curva concentración-respuesta a 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M), en presencia del inhibidor de los canales Kv, la 4-AP (2×10^{-3} M) y en ausencia de este.

En la cepa SHR la vasoconstricción inducida por la 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M) en ausencia de 4-AP, fue significativamente mayor que en WKY a las concentraciones más elevadas de 3×10^{-7} M a 10^{-5} M (Figura 30).

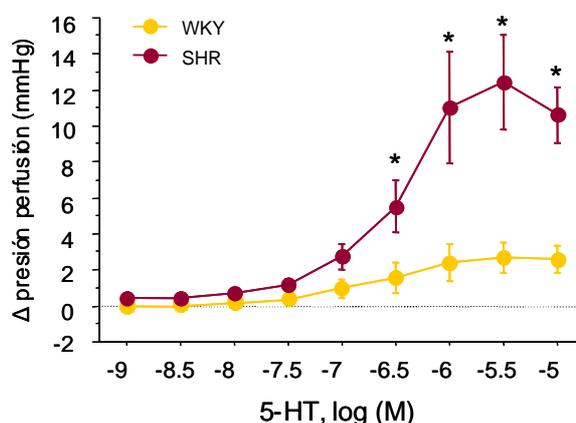


Figura 30: Curva concentración-respuesta de 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M) en el lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mm Hg. Cada resultado representa la media \pm E.S de $n=9$ determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

Por otro lado, en la cepa WKY, la contracción inducida por la 5-HT, en presencia de la 4-AP, fue significativamente mayor que en ausencia del inhibidor (Figura 31A). Sin embargo, en la cepa SHR, la contracción inducida por la 5-HT fue similar tanto en ausencia como en presencia de la 4-AP (Figura 31B). Por consiguiente, a la edad de 4 semanas, ya existe un efecto anticontráctil del ADRF en la cepa normotensa, WKY, que no existe en la cepa SHR. Estos resultados correlacionan con que a la edad de 4 semanas la cepa SHR ya presenta unos valores significativamente menores de tejido adiposo mesentérico, que su control normotenso.

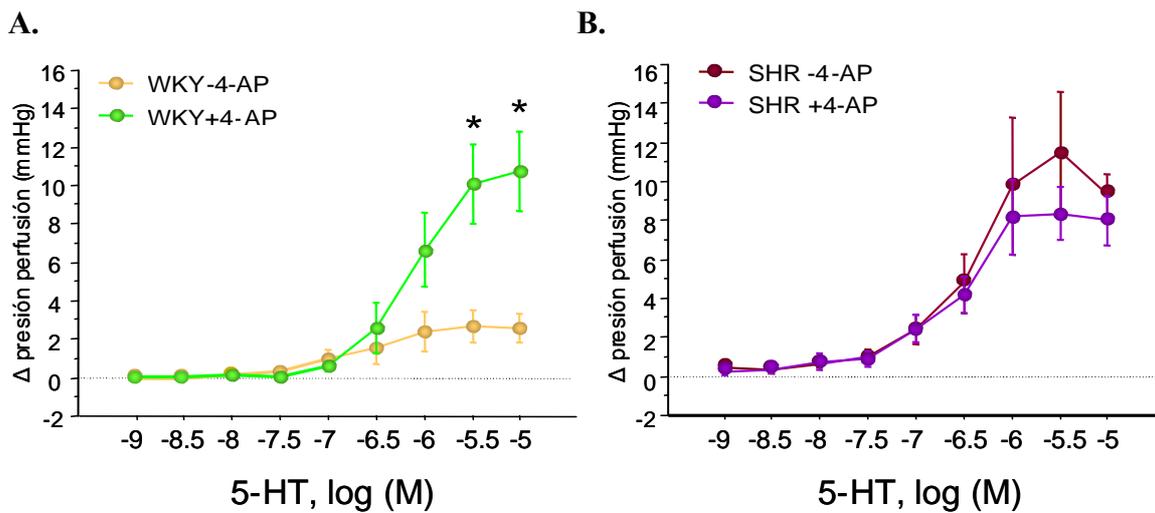


Figura 31: Curva concentración-respuesta de 5-HT (10^{-9} - 10^{-5} M) en el lecho vascular mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad, en presencia y en ausencia de 4-AP, WKY (A) y SHR (B). Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mmHg. Cada resultado representa la media \pm E.S de n=6 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

6.2 Liberación basal de ADRF

La liberación basal del ADRF se determinó preincubando el lecho vascular mesentérico con la 4-AP (2×10^{-3} M), durante 20 min. El incremento de la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico inducido por la 4-AP, fue similar en ambas cepas (Figura 32). Esto sugiere que a la edad de 4 semanas, la liberación basal del ADRF no está aún modificada en SHR, aunque ya existen diferencias significativas en el efecto anticontráctil, del tejido adiposo perivascular mesentérico, en respuesta a agentes vasoconstrictores, tales como la 5-HT.

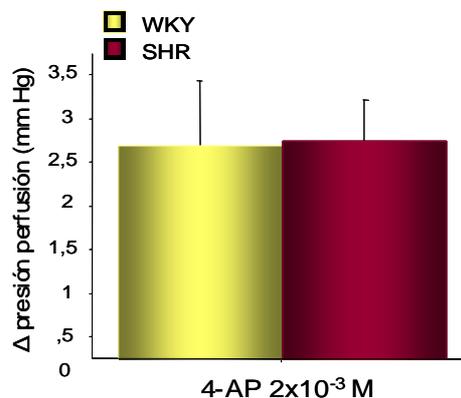


Figura 32: Efecto 4-AP 2×10^{-3} M de la sobre la presión de perfusión del lecho mesentérico de WKY y SHR de 4 semanas de edad. Los resultados están expresados como incremento de la presión basal de perfusión en mmHg. Cada resultado representa la media \pm E.S de n= 10-13 determinaciones/cepa.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que las alteraciones en la cantidad y función del TA perivascular podrían contribuir al incremento de la resistencia vascular observada en SHR y además, son previas al desarrollo de la hipertensión.

El TA blanco es un órgano endocrino que produce numerosos factores vasoactivos tales como el ADRF (Löhn y cols., 2002). El lecho vascular mesentérico contribuye significativamente a las resistencias vasculares periféricas y está rodeado de una gran cantidad de TA (blanco) perivascular. Debido a que el TA perivascular regula el tono vascular de las arterias mesentéricas a través de la activación de los canales Kv (Verlohren y cols., 2004) y que la cantidad de grasa visceral es directamente proporcional a la prevalencia de la hipertensión (DiGirolamo y cols., 1998), se eligió como modelo el lecho vascular mesentérico para caracterizar la contribución del TA perivascular en la resistencia vascular de un modelo de hipertensión.

El TA mesentérico de las ratas SHR presentó un peso y un volumen menores que las ratas normotensas, WKY, de la misma edad y peso. Las ratas SHR presentaron además, una menor cantidad de TA lumbar que las ratas WKY. Por lo que la menor cantidad de TA perivascular que presenta la cepa SHR no es exclusiva del lecho vascular mesentérico, existiendo por tanto, una reducción de la cantidad de grasa visceral en SHR. Esta diferencia se debe a que las ratas SHR (12 semanas de edad) presentan una menor cantidad de TA mesentérico con adipocitos más pequeños (diámetro WKY $36,9 \pm 3 \mu\text{m}$ y SHR $26,9 \pm 4,3 \mu\text{m}$) y con un menor contenido en lípidos totales pero sin cambios en el número de células.

Esta menor cantidad de TA perivascular mesentérico podría ser una consecuencia de la hiperreactividad simpática observada en SHR (Frohlich y Pfeffer, 1975; Cabassi y cols., 2002) que conduciría a un incremento de la lipólisis (Youngstrom y cols., 1998; Hausman y cols., 2001). En los roedores las catecolaminas controlan la movilización de los lípidos y la lipólisis, en los adipocitos, a través de los receptores β_3 -adrenérgicos que activan la adenilato ciclasa, la proteína quimasa dependiente de AMPc y la hormona sensible a la lipasa. Lo cual resulta en la hidrólisis de los triglicéridos y en la disminución del tamaño de los adipocitos. Este mecanismo es de especial importancia

en el TA mesentérico ya que presenta una densa inervación simpática (Youngstrom y cols., 1995). Además, los adipocitos mesentéricos son más sensibles, que los adipocitos de otros tejidos adiposos, al efecto inhibitorio de la insulina sobre la lipólisis inducida por las catecolaminas. De esta manera, los menores niveles de insulina encontrados en SHR estarían favoreciendo la lipólisis inducida por las catecolaminas en el TA mesentérico y lumbar de esta cepa. Sin embargo, el recambio de noradrenalina o actividad noradrenérgica, determinada como la relación entre DOMA/NA en el TA lumbar fue similar entre ambas cepas a las dos edades estudiadas (4 y 12 semanas de edad). Dichos resultados sugieren como posible mecanismo, a factores genéticos que determinarían la cantidad de TA perivascular.

El primer objetivo de este capítulo fue determinar si el TA mesentérico contribuía al mantenimiento del tono vascular en SHR (12 semanas, hipertensión establecida). Debido a que en los animales normotensos el TA perivascular mesentérico regula el tono arterial mesentérico a través de la apertura de canales Kv (Verlohren y cols., 2004), se analizó el efecto del bloqueante de estos canales, la 4-aminopiridina, en el lecho vascular mesentérico de SHR de 12 semanas de edad. El hecho de que la 4-aminopiridina, induzca un incremento de la presión basal de perfusión del lecho mesentérico mayor en WKY que en SHR, sugiere que el efecto anticontráctil del TA perivascular mesentérico está mediado a través de los canales de potasio dependientes de voltaje y además, depende de la cantidad de TA perivascular, ya que se encontró que existía una correlación positiva entre la respuesta contráctil inducida por la 4-AP y la cantidad de TA mesentérico, es decir, a menor cantidad de TA mesentérico menor es la respuesta contráctil inducida por la 4-AP.

Es importante destacar que las diferencias en la respuesta a la 4-aminopiridina, observadas entre WKY y SHR de 12 semanas de edad, pueden ser atribuidas a un efecto anticontráctil del TA perivascular, puesto que no son debidas a una diferencia en la sensibilidad a la hiperpolarización de membrana de las células de músculo liso vascular, ni a un efecto mecánico producido por la diferente cantidad de TA mesentérico. Esto se demuestra porque las respuestas a KCl 75 mM y a NPS son similares en ambas cepas. Tampoco se debe a una menor respuesta relajante dependiente o independiente de endotelio, ya que no existen diferencias entre ambas cepas en la respuesta a Ach, ni a NPS, respectivamente.

Nuestros resultados sobre la respuesta relajante dependiente de endotelio, coincide con los resultados de otros investigadores, que encontraron que la respuesta relajante de las arterias mesentéricas a la Ach era resistente al bloqueo de la liberación de NO con inhibidores de la NOS como el L-NAME (Parson y cols., 1994), y que la cepa SHR no presenta disfunción endotelial en las arterias mesentéricas al no existir diferencias, con respecto a su control normotenso, en la respuesta relajante inducida por la Ach (Hendriks y cols., 1993; Kong y cols., 1991; Randall y cols., 1991).

La cepa SHR no es sólo un modelo de hipertensión es también un modelo de resistencia a la insulina con hipertrigliceridemia e intolerancia a la glucosa (Reaven y cols., 2004). Sin embargo, nuestras ratas SHR presentaron concentraciones plasmáticas de triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres y glicerol inferiores a las normotensas, WKY. Las determinaciones plasmáticas se realizaron con muestras de sangre extraídas por la mañana en animales no ayunados, por lo que los resultados obtenidos representan los valores postpandriales. Debido a que el ayuno estimula la movilización de lípidos y la lipólisis, se evitaron los ayunos prolongados (24h) para evitar la disminución de la cantidad de TA mesentérico que provocan estos dos procesos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la disfunción vascular que presentan las ratas SHR es independiente de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lipoproteínas. Además, las alteraciones funcionales del TA perivascular asociadas con la menor cantidad de este tejido podrían desempeñar un importante papel en el desarrollo y mantenimiento de la elevada presión arterial presente en esta cepa.

El siguiente objetivo fue determinar si las alteraciones encontradas en las ratas SHR de 12 semanas de edad, en la función y cantidad de TA perivascular, eran previas o posteriores al establecimiento de la hipertensión arterial. Para ello, se utilizaron ratas WKY y SHR de 4 semanas de edad, que presentaban unos valores similares de presión arterial sistólica, confirmando que a esta edad la hipertensión no estaba aún establecida en SHR.

Las ratas SHR, a la edad de 4 semanas, ya presentan una menor cantidad de TA mesentérico y lumbar que las ratas WKY. La reducción en la cantidad de TA mesentérico es de aproximadamente un $19 \pm 1\%$ comparado con WKY. Reducción muy similar a la encontrada en las ratas SHR de 12 semanas de edad en las que la

hipertensión ya está establecida ($17 \pm 1\%$). De esta manera, la menor cantidad de TA perivascular parece estar ligada a la cepa SHR y no al grado de hipertensión arterial.

En los animales de 4 semanas, la menor cantidad de TA mesentérico tampoco modifica la presión basal de perfusión del lecho vascular mesentérico, ni la respuesta contráctil al KCl, pero modula la respuesta contráctil a agentes vasoconstrictores, como la 5-HT. De esta manera, la 4-AP indujo un incremento significativo de la presión basal de perfusión del lecho vascular mesentérico en respuesta a 5-HT en WKY pero no en SHR, existiendo por tanto, una reducción del efecto anticontráctil del TA perivascular en SHR desde su estadio prehipertenso.

Estas diferencias en el efecto anticontráctil del TA perivascular no fueron debidas a un efecto mecánico producido por la diferente cantidad de TA mesentérico, puesto que la respuesta vascular a KCl y al nitroprusiato sódico fue similar entre WKY y SHR. También descartamos que fueran debidas a diferencias en la sensibilidad de las células de músculo liso vascular a la despolarización de la membrana, ni a diferencias en respuesta endotelial dependiente de NO o EDHF, ya que la respuesta a Ach en presencia y en ausencia de L-NAME fue similar entre ambas cepas.

Respecto a la respuesta vasoconstrictora de las arterias mesentéricas de ratas SHR prehipertensas, algunos investigadores no han encontrado diferencias en comparación con su control normotenso, WKY (Tsuji y cols., 1989), mientras que otros investigadores han encontrado un incremento de la respuesta contráctil de SHR que parece ser debido a alteraciones estructurales de la pared vascular del lecho mesentérico (Lee, 1985; Dickhout y Lee, 1989; Kong y cols., 1991; Rizzoni y cols., 1994; Le Marquer-Domagala y Finet., 1997). Estas alteraciones incluyen el incremento del volumen de la capa media y del número de capas musculares lisas, sin cambios en el diámetro de la luz del vaso en estado relajado (Dickhout y Lee, 1989). Sin embargo, a pesar del engrosamiento de la pared vascular y del incremento de la relación capa media/lumen de las arterias y arteriolas mesentéricas, no existen diferencias en la presión basal de perfusión entre ambas cepas (Rizzoni y cols., 1994).

Comparando ambas edades observamos que el efecto anticontráctil del TA perivascular disminuye con la edad en WKY, puesto que el efecto de la 4-AP (efecto anticontráctil) sobre la curva de 5-HT a las 12 semanas de edad es menor que a las 4 semanas. Sin embargo, en SHR a ninguna de las dos edades existen diferencias en el

efecto de la 4-AP sobre la respuesta vascular del lecho mesentérico a la curva concentración-respuesta de 5-HT. Además, la liberación basal de ADRF a las 4 semanas de edad es similar entre WKY y SHR, pero en los animales de 12 semanas de edad, cuando la hipertensión esta establecida, existe una reducción en la liberación basal de ADRF en la cepa SHR.

En resumen, el presente capítulo apoya los resultados previamente publicados de que el TA perivascular participa en la regulación del tono vasomotor. Sugiere que la menor cantidad de TA perivascular facilita la respuesta contráctil de las arterias mesentéricas y apoya el concepto de que el aumento de la resistencia periférica que se asocia a la hipertensión podría ser debido en parte a una alteración de la regulación paracrina del TA perivascular sobre el tono arterial mesentérico mediado a través de los canales de Kv. Además, los resultados obtenidos en las ratas SHR de 4 semanas sugieren que las alteraciones en la cantidad y función del TA perivascular son previas al establecimiento de la HTA y pueden contribuir al incremento de la resistencia vascular observada en SHR.

Estos resultados parecen ser contradictorios con el hecho de que a mayor cantidad de grasa visceral abdominal exista mayor prevalencia de hipertensión. Sin embargo, una posible hipótesis es que en condiciones de normopeso exista un efecto beneficioso del TA perivascular, al aumentar la liberación de factores vasodilatadores como el ADRF. Y en condiciones distintas al normopeso (aún por determinar), exista un desequilibrio entre la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores por parte del TA perivascular que conduzcan a la elevación de la presión arterial. De hecho, en un modelo de obesidad inducida por la exposición prenatal a nicotina se ha descrito una reducción en la liberación de ADRF por el TA periaórtico de estos animales (Gao y cols., 2005). Además, estos investigadores (Gao y cols., 2006), describieron que el TA perivascular de ratas WKY de 25-32 semanas de edad, incrementa la vasoconstricción mediada por la activación de las terminaciones nerviosas perivacuulares en respuesta a la estimulación eléctrica. Este aumento es debido al incremento de la liberación de aniones superóxido por parte del TA perivascular que conduce a la activación de la tirosina quinasa y de la vía de MAPK/ERK.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el TA perivascular juega un papel fisiológico/patológico importante en la modulación de la función vascular.

CAPÍTULO II

Cuantificación de los niveles de leptina del tejido adiposo perivascular y caracterización de su efecto vascular

INTRODUCCIÓN

1. Leptina

La leptina es un péptido de 167 aminoácidos, producto del gen *ob*. Su nombre proviene de la palabra griega leptos, que significa delgado, lo que se debe a su evidente función en el control del peso corporal a través de la regulación del apetito y la termogénesis. Fue identificada por Zhang y cols., en 1994, en el tejido adiposo.

Esta proteína contiene una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de pasar al torrente circulatorio. La proteína madura, de 146 aminoácidos, tiene un peso molecular de 16 kD y posee una estructura terciaria con un conjunto de cuatro hélices, similar a las citoquinas clásicas de hélice larga de clase I, como la interleucina 2 (IL-2) (Simón y cols., 2002), la IL-6, la IL-11, la IL-12, el factor inhibitorio de la leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), etc (Madej y cols., 1995; Prolo y cols., 1998). Además, la molécula contiene un enlace disulfuro intercadena, que al parecer es necesario para su actividad biológica.

El gen *ob* se localiza en el cromosoma 6 en el ratón y en el cromosoma 7 en humanos (Isse y cols., 1995). Este gen está constituido por tres exones, separados por dos intrones, de los cuales la región que codifica la síntesis de leptina se localiza en los exones 2 y 3. La leptina presenta pocas variaciones interespecie; así la leptina humana presenta una homología del 83% con la leptina de rata y del 84% con la de ratón (Zhang y cols., 1994).

Las mutaciones en el gen *ob* revelaron el decisivo permitió establecer la importancia de dicha hormona en la regulación del peso corporal y su implicación en el origen de la obesidad, no sólo en roedores, sino también en humanos (Zhang y cols., 1994; Montague y cols., 1997; Larsson y cols., 1998).

Los ratones *ob/ob* presentan una obesidad de inicio temprano, hiperfagia, hipotermia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, así como otras alteraciones metabólicas y neuroendocrinas (Zhang y cols., 1994). En seres humanos, las mutaciones del gen *ob* son infrecuentes (Ahima y Flier, 2000) y causan obesidad mórbida, hiperfagia e hipogonadismo hipotalámico (Barr y cols., 1997).

Un fenotipo similar presentan los ratones *db/db* y la denominada rata Zucker *fa/fa* (Yamashita y cols., 1997). Se ha comprobado que en ratones *ob/ob* la

administración de leptina corrige la obesidad (Campfield y cols., 1995 y Pelleymounter y cols., 1995), pero no ocurre así en los ratones *db/db*. Hoy se sabe que el ratón *ob/ob* se caracteriza por la producción de leptina no funcional (Pelleymounter y cols., 1995; Weigle y cols., 1995), mientras que el ratón *db/db* presenta en el receptor de leptina un dominio intracelular anormal que hace que sea incapaz de activar su mecanismo de transducción (Tartaglia y cols., 1995; Chen y cols., 1996; Lee y cols., 1996). En la rata Zucker *fa/fa* se observa una mutación en el dominio extracelular del receptor que disminuye su afinidad por la leptina (Yamashita y cols., 1997).

Es importante resaltar, que tanto los modelos animales de obesidad como la obesidad humana, suelen estar relacionados con una resistencia a la acción de la leptina más que con una deficiencia en la producción de la misma (Caro y cols., 1996; Houseknecht y cols., 1998; Friedman, 1998). De hecho, la hiperleptinemia es una situación frecuente en animales y en individuos obesos (Houseknecht y cols., 1998 y referencias citadas).

1.1 Síntesis, liberación y metabolismo de la leptina

La leptina se secreta principalmente por el tejido adiposo blanco (adipocitoquina). En condiciones normales cuando se produce un aumento de grasa en el organismo, se incrementa la secreción de leptina, que actúa sobre el hipotálamo para disminuir el apetito y aumentar el metabolismo basal (Banks, 2004; Frühbeck, 1998 y 2001; Ravussin, 2002; Unger, 2004).

Los niveles circulantes de leptina correlacionan con el índice de masa corporal y la cantidad de tejido adiposo corporal (Banks, 2004; Frühbeck, 1998 y 2001). Sin embargo, el tejido adiposo blanco no es la única fuente de leptina. También se sintetiza en menor medida por el tejido adiposo marrón (Trayhurn y cols., 1999), las células glandulares del fundus del estómago (Bado y cols., 1998), el músculo esquelético, el epitelio mamario, la placenta, la médula espinal, el hipotálamo, la pituitaria (Ahima y Flier, 2000; Wauters y cols., 2000), y cultivos primarios de osteoblastos (Reseland y cols., 2001). En el caso del tejido adiposo, la secreción se lleva a cabo en diversas localizaciones como: subcutánea, omental, retroperitoneal, perilinfática. Cada uno de estos tejidos contribuye a los niveles de leptina en diferente cantidad dependiendo del tamaño del depósito y de sus características metabólicas. Se ha comprobado que la

expresión de leptina es mayor en la grasa subcutánea que en la visceral (Montague y cols., 1997; Van Harmelen y cols., 1998).

Una vez secretada al torrente circulatorio, la leptina circula parcialmente unida a proteínas plasmáticas, que regulan su vida media, así como sus funciones biológicas (Houseknecht y cols., 1996). En individuos delgados, con una cantidad relativamente pequeña del tejido adiposo, la mayoría de la leptina circula unida a proteínas plasmáticas, mientras que en los individuos obesos la proporción de leptina libre en suero es mayor (Houseknecht y cols., 1996; Sinha y cols., 1996).

La liberación de leptina presenta un ritmo circadiano con concentraciones plasmáticas ligeramente más altas durante el día en el hombre y durante la noche en roedores (Kastin y cols., 2000; Sinha y cols., 1996). La expresión de leptina en el adipocito se regula a nivel transcriptional, condicionada por la cantidad de tejido adiposo blanco y el tamaño del adipocito. Además, su expresión y los niveles séricos aumentan después de la ingesta y se suprime rápidamente con el ayuno, el cual si es prolongado, reduce considerablemente la cantidad de tejido adiposo y el tamaño del adipocito (Peelman y cols., 2004). Aunque la masa grasa corporal es el principal determinante de los niveles séricos leptina, su secreción está regulada por numerosos factores. De todos ellos el mejor caracterizado es la insulina, la cual estimula su secreción desde el tejido adiposo, tanto *in vivo* como *in vitro* (Barr y cols., 1997; Houseknecht y cols., 1998; Havel, 2001). Ambas parecen actuar informando al cerebro del contenido corporal de grasa y regulando así la ingesta y el peso corporal (Baskin y cols., 1999). También el TNF- α y la interleucina-1 son citoquinas que parecen aumentar la expresión y la secreción de leptina, tanto en roedores como en humanos. Igualmente, la administración de glucocorticoides, como el cortisol, pueden aumentar la expresión de leptina (Simón y cols., 2002). A este respecto, los estudios realizados en ratas han demostrado una regulación negativa entre la leptina y el cortisol, de modo que la propia leptina es capaz de inhibir la síntesis adrenal de cortisol (Bornstein y cols., 1997).

Por otro lado, la leptina también está sometida a una regulación nerviosa, principalmente, a través del sistema simpático. Se ha descrito que la administración de agonistas β -adrenérgicos produce una inhibición en la expresión del gen *ob* en el tejido adiposo blanco así como una disminución en los niveles de leptina circulante (Deng y cols., 1997). También estímulos como el frío, el consumo de tabaco o el ejercicio físico pueden reducir los niveles de leptina por estimulación simpática (Simón y cols., 2002).

El aclaramiento plasmático de la leptina es rápido, lo que condiciona su corta vida media (unos veinticinco minutos para la leptina endógena, y de noventa minutos, para la exógena (Cumin y cols., 1996). Su eliminación se produce, fundamentalmente, a nivel renal (Simón y cols., 2002) por filtración glomerular y degradación metabólica en los túbulos renales (Cumin y cols., 1996 y 1997).

1.2 Receptores de leptina

La leptina actúa vía receptores transmembrana, que pertenecen a la familia de los receptores de citoquinas clase I (Löllmann y cols., 1997; Tartaglia, 1997).

El receptor de leptina (Ob-R) se codifica por el gen *db*. Fue identificado en el plexo coroideo de ratón por Tartaglia y cols en 1995. Hasta el momento se han descrito seis tipos de receptores de leptina: Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re, Ob-Rf (Tartaglia y cols., 1995) capaces de formar homodímeros en ausencia de leptina, y que se activan mediante cambios conformacionales inducidos por ligando (Devos y cols., 1997). Estos receptores presentan: i) un dominio extracelular idéntico, de unos 800 aminoácidos, localizado en el extremo aminoterminal, donde se encuentra el sitio de unión de la leptina; ii) un dominio transmembrana de 34 aminoácidos; iii) y un dominio intracelular variable, característico de cada isoforma.

Así las isoformas se pueden clasificar en tres clases: corta, larga y soluble. Las formas cortas del receptor, Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf, contienen 30-40 residuos citoplásmicos. Sin embargo, solamente la isoforma larga, Ob-Rb, se consideró inicialmente receptor funcional, debido a que tiene un dominio intracelular de aproximadamente 300 residuos citoplásmicos (más de largo en seres humanos que en ratón), y las dos regiones necesarias (Box 1 y Box 2) para la interacción con otras proteínas y la subsecuente activación de la vía de señalización (Tartaglia y cols., 1995). La isoforma soluble, Ob-Re, carece de dominio transmembrana e intracelular. Es el determinante principal de los niveles plasmáticos de leptina. Tiene una gran afinidad por la leptina circulante y parece actuar regulando los niveles plasmáticos de esta (Chan y cols., 2002; Hegyi y cols., 2004). Al unirse a la leptina libre, el complejo leptina-Ob-Re formado no es capaz de activar al Ob-Rb, por lo que dicho receptor actuaría secuestrando a la leptina libre e impidiendo su unión al receptor Ob-Rb y la activación de la vía de señalización (Yang y cols., 2004).

El Ob-Ra y Ob-Rc se localizan principalmente, en el plexo coroideo y los microvasos cerebrales (Tartaglia y cols., 1995; Bjørnbæk y cols., 1998), en donde se encargan de transportar la leptina al sistema nervioso central (SNC) a través de un mecanismo de transporte saturable, para acceder a los núcleos hipotalámicos y allí ejercer sus funciones (Tartaglia y cols., 1995; Schwartz y cols., 2000; Campfield y cols., 1995; Banks y cols., 1996; Golden y cols., 1997). El Ob-Rb, conocido como forma larga del receptor, se expresa principalmente en el hipotálamo concretamente en los núcleos arqueado, el ventromedial y el paraventricular (Schwartz y cols., 1996; Couce y cols., 1997). En estos núcleos, sobre todo en el NAR, existen neuronas que sintetizan mediadores relacionados con el control de la ingesta y la termogénesis como el neuropéptido Y (NPY) o la proopiomelanocortina (POMC). También se ha localizado el receptor Ob-Rb en el hipocampo, la corteza (Funahashi y cols., 2003), en el área ventral tegmental y en la sustancia negra (Figlewicz y cols., 2003).

En la periferia, el receptor Ob-Rb se ha identificado en los tubos colectores y en los uréteres, así como en la zona glomerulosa del riñón (Chen y cols., 1999; Bornstein y cols., 2000). También se ha localizado en el pulmón y en el hígado (Fei y cols., 1997) y en el endotelio vascular (Sierra-Honigmann y cols., 1998). En el páncreas el receptor Ob-Rb y el Ob-Ra se localizan en las células β , donde la leptina inhibe la liberación de insulina (Tanizawa y cols., 1997). En estudios *in vitro*, se ha localizado también el receptor Ob-Rb en el citoplasma de los adipocitos, y en otros componentes del tejido adiposo, como son las células endoteliales y los macrófagos (Bornstein y cols., 2000). También en los linfocitos CD4 y CD8, las células NK, los enterocitos (Fruhbeck, 2001) y en cultivos de células del músculo liso vascular (Rodríguez y cols., 2006).

1.2.1 Internalización del receptor de leptina

En condiciones normales se estima que sólo el 5-25 % de las isoformas del Ob-R se encuentra presente en la superficie celular, estando la mayoría contenidas en vesículas intracelulares (Barr y cols., 1999). Tanto el Ob-Ra como Ob-Rb median la internalización y la degradación lisosomal, siendo los aminoácidos 8-29 del dominio intracelular determinantes en el proceso (Sweeney, 2002; Lundin y cols., 2000).

Ambas isoformas son proteínas membrana efímeras que siguen rutas intracelulares similares, a pesar de que de sus dominios citoplásmicos presenten diferencias estructurales y funcionales (Belouzard y cols., 2004).

1.3 Vías de señalización de la leptina

La ruta de las JAK-STAT es la principal vía de señalización de la leptina (Vaisse y cols., 1996; Björbaek y cols., 1997). El Ob-R interacciona con las proteínas JAKs (principalmente la JAK2) y STAT a través de las regiones intracelulares Box1 y Box2 (Murakami y cols., 1991; Jiang y cols., 1996). La región Box 1, rica en prolina, corresponde a los aminoácidos intracelulares 6-17. Esta región y los aminoácidos intracelulares 31-36 son indispensables para la interacción del Ob-R con las proteínas JAKs (Kloek y cols., 2002).

El dominio intracelular de todas las isoformas del Ob-R contiene la región Box1, mientras que solamente, el Ob-Rb presenta también la región Box2 y los sitios de unión a la STAT. Bahrenberg y cols (2002) demostraron que la región Box 2 no era necesaria para la interacción con las proteínas JAKs. Sin embargo, sin esta región no sería posible la activación de la vía de señalización de la STAT (Murakami y cols., 1997). Por lo tanto, aunque inicialmente solamente se consideró al OB-Rb el implicado en la transducción de la señal de leptina, las isoformas cortas también han demostrado capacidades de señalización diferentes (Murakami y cols., 1997; Björbaek y cols., 1998; Yamashita y cols., 1997).

En la región intracelular del receptor Ob-Rb existen otras secuencias de aminoácidos sin los cuales no sería posible la activación de las STAT. Entre éstos hay dos aminoácidos cruciales para dicha señalización: Leu896 y Leu897 (Hegyí y cols., 2004). Por otro lado, este receptor contiene tres residuos de tirosina en las posiciones 985, 1077 y 1138, necesarios también en el proceso de señalización (Banks y cols., 2000). De esta manera, la Tyr985 es necesaria para la activación de la vía de señalización de Ras/Raf/ERK. Mientras que las Tyr1077 o Tyr1138 son necesarias para la activación del STAT5 y la Tyr1138 es esencial para la activación de STAT3 (Frühbeck, 2006).

Para activar la cascada de señalización JAK-STAT se produce inicialmente la unión de la leptina al Ob-Rb. Esta unión hace que las JAK2 citoplasmáticas se unan a la región proximal del Ob-Rb y se autofosforilen (Björbaek y cols., 1997). Las JAK2

fosforilan las Tyr985 y Tyr1138 del receptor. Estas tirosinas fosforiladas servirán como sitios de unión para una proteína con dominios SH2 (src homology 2) denominada STAT3 (Banks y cols., 2000) que, a continuación, se fosforila por las JAK2. La STAT3 fosforilada (pSTAT3) se separa del receptor y forma homo- y heterodímeros. Los heterodímeros de pSTAT3 formados actúan en el núcleo como reguladores transcripcionales de diversos genes o factores, incluido el SOCS3 (*supressor of cytokine signaling-3*) (Björbaek y cols., 1999; Hegyi y cols., 2004) (Figura 33). La proteína SOCS3 contiene también dominios SH2. Se encuentra en neuronas hipotalámicas que expresan NPY o POMC (Sahu y cols., 2003).

Como reguladores negativos de dicha señalización se encuentran: 1) el SOCS3, que bloquea la fosforilación de las proteínas JAK y la activación de las proteínas STAT (Endo y cols., 1997), 2) las proteínas PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*), que desfosforilan la JAK2 (Bjørbaek y Kahn, 2004; Sahu, 2004) y 3) las proteínas PIAS3 (*protein inhibitor of activated STAT*) que bloquean la unión de la STAT3 al ADN e inhiben la transcripción génica mediada por la STAT3 (Chung y cols., 1997) (Figura 33).

La unión de la leptina a su receptor es capaz de activar los STAT3, 5 y 6 (Sweeney, 2002).

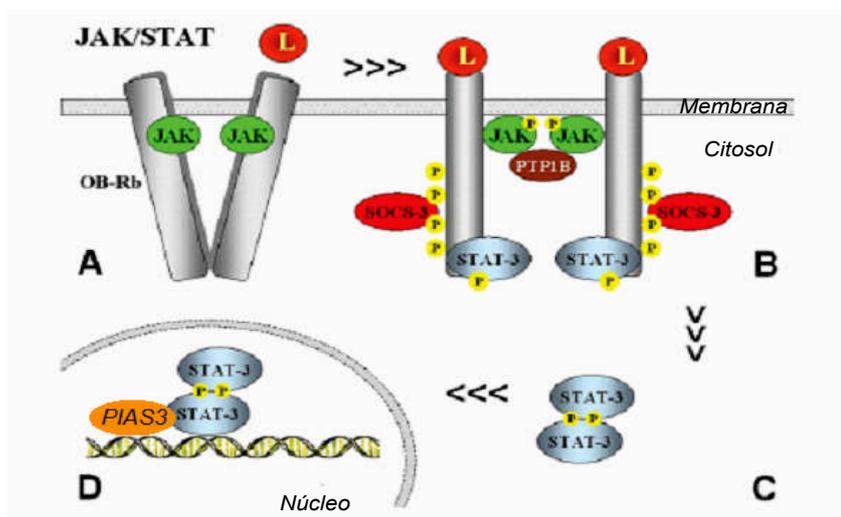


Figura 33: Esquema de la señalización intracelular de leptina a través de las JAK-STAT. Modificado de Frühbeck G., 2006 JAK, *Janus tyrosine kinase*; STAT3, *signal transducer and activator of transcription*; SOCS3, *supressor of cytokine signaling-3*; PTP1B, *protein tyrosine phosphatase 1B*; PIAS3, *protein inhibitor of activated STAT*.

Además, el Ob-Rb y en menor medida, el Ob-Ra, son capaces de activar la vía de señalización de la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Bjørnbæk y cols., 1997); Banks y cols., 2000) (Figura 34).

Esta activación de la vía de señalización de la MAPK se ha observado *in vivo* e *in vitro*, así como a nivel central y periférico. En el tejido adiposo blanco la leptina estimula la actividad de la NOS a través de un mecanismo complejo que implica a la PKA y al p42/44 MAPK (Mehebig y cols., 2005).

Además, la leptina al igual que otras citoquinas, y factores de crecimiento es capaz de activar a la JNK (*the stress-activated protein kinase*) (Figura 34). De esta manera, en las células de Kupffer tratadas con lipopolisacáridos, produce un aumento del TNF α vía p38 y JNK MAPK y en células de músculo liso vascular, induce hipertrofia vía p38 MAPK. Lo que indica el importante papel de esta hormona en la fisiología cardiovascular y en el remodelado vascular (Frühbeck, 2006).

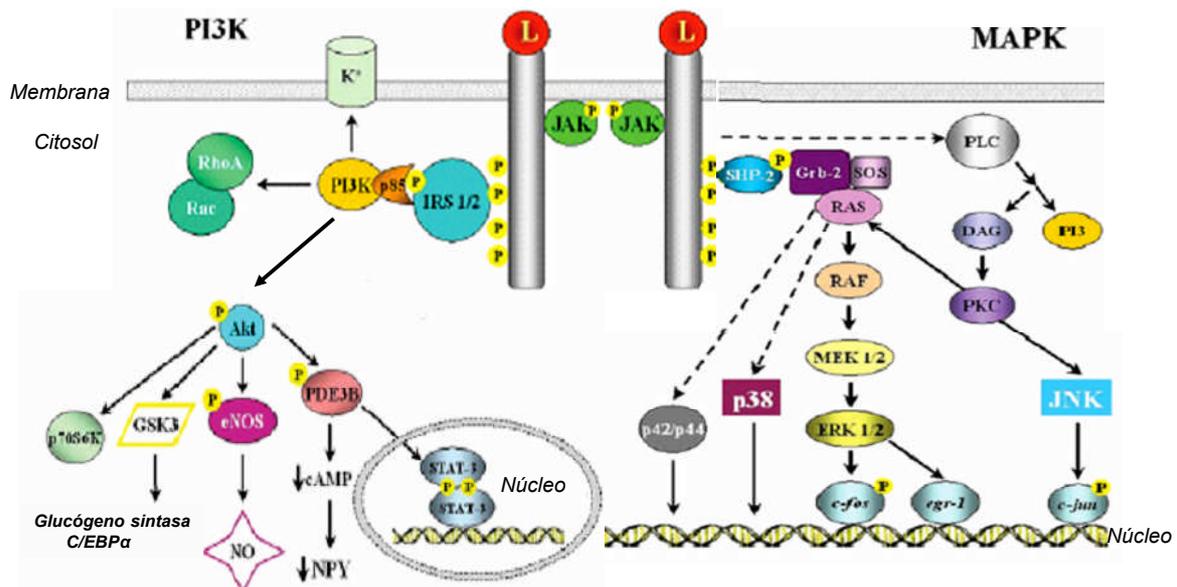


Figura 34: Esquema de la interacción del receptor de leptina con las vías de la PI3K y de la MAPK. Modificado de Frühbeck., 2006. IRS, sustratos del receptor de insulina; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinasa; PDE3B, fosfodiesterasa 3B.C/EBP; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipasa C.

Por otro lado, tanto en el sistema nervioso central como en el tejido adiposo, el páncreas o el hígado, la vía de señalización de la leptina puede interactuar con la

cascada de señalización de la insulina Zhao y cols., 1998; 2000; 2003). Esta vía de señalización es dependiente de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K) e implica la activación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) (Miki y cols., 1996) y la reducción de los niveles de AMPc, que es capaz de competir con la STAT3 por su unión al receptor (Figura 33). De esta manera, la leptina en las células β -pancreáticas, inhibe la liberación de insulina inducida por el péptido similar al glucagón 1 (Zhao y cols., 2000). Sin embargo, los mecanismos de interacción entre la leptina y la insulina pueden diferir en función del tipo de célula.

1.4 Efectos fisiológicos de la leptina

De acuerdo con una distribución casi ubicua de sus receptores, la leptina desempeña una amplia variedad de funciones biológicas en el sistema nervioso central como en la periferia (Frühbeck, 2001; 2002; Baratta, 2002; Muoio y Dohm, 2002; Harvey y Ashford, 2003; Bjørnbæk y Kahn, 2004).

Dichas acciones incluyen desde su efecto sobre el balance energético, que ejerce a nivel central como factor saciante, regulador de la ingesta y del peso corporal, al reducir la síntesis del NPY (potente orexigénico) y estimular a las neuronas que secretan POMC (anorexígeno) (Schwartz y cols., 2000). Y a nivel periférico (tejido adiposo marrón, el riñón, el músculo esquelético, la glándula adrenal) al activar el tono simpático y aumentar la termogénesis (al incrementar la actividad de las proteínas desacoplantes, UCPs, implicadas en la disipación de energía en forma de calor) y el gasto energético (Dunbar y cols., 1997; Da-Wei y cols., 1997).

A multitud de efectos sistémicos, como en la función reproductiva y el desarrollo, en la función inmunitaria: estimula hematopoyesis y la actividad fagocitaria de los macrófagos; en la angiogénesis, en la formación de hueso, en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis adrenal, en metabolismo: al facilitar la utilización de la glucosa (Trayhurn y cols., 1999) y mejorar sensibilidad de la insulina y en estimulación de la lipólisis (Simón y cols., 2002).

1.4.1 Leptina y función vascular

Recientemente se ha visto que la leptina también contribuye a la homeostasis del tono vascular (Frühbeck, 1999, Lembo y cols., 2000; Vechhione y cols., 2002, Fortuño y

cols., 2002). Sus efectos hipotalámicos tendrían como consecuencia un aumento de la presión arterial, por activación del sistema nervioso simpático (Frühbeck, 1999), mientras que el efecto vascular directo, que ejerce sobre sus receptores presentes en la capa muscular (Fortuño y cols., 2002) y en el endotelio vascular, sería vasodilatador (Frühbeck, 1999).

La leptina induce vasodilatación directa a través de mecanismos endoteliales que difieren en función de lecho vascular estudiado. En vasos de conductancia, como la aorta de rata, la leptina produce vasodilatación por liberación de NO mediante la activación de la NOS endotelial a través de la fosforilación de la proteína serina/treonina quinasa denominada Akt (Vechhione y cols., 2002). Este efecto vasodilatador dependiente de NO endotelial se confirmó al inhibirse en presencia del inhibidor inespecífico de la NOS, el L-NAME y en ausencia de endotelio (Lembo y cols., 2000; Vechhione y cols., 2002).

En cambio, en vasos de resistencia, como las arterias mesentéricas, el efecto vasodilatador de la leptina se produce por liberación del EDHF, ya que la relajación mediada por la leptina disminuye en presencia del inhibidor del EDHF, brefeldina A (Lembo y cols., 2000). Por otro lado, Rodríguez y cols (2007) han sugerido recientemente que la leptina produce vasodilatación por efecto directo sobre la capa media, al bloquear la entrada de calcio a las células de músculo liso vascular inducida por la Ang II, y disminuir la respuesta contráctil inducida por la Ang II, al incrementar la producción de NO en las células de músculo liso vascular principalmente a través de la NOS inducible.

Además, Vechhione y cols (2003) han demostrado que la insulina y la leptina participan conjuntamente en la modulación del tono vascular. La insulina potencia la vasodilatación inducida por la leptina, incrementando la liberación de NO, al aumentar la fosforilación de la NOS endotelial mediada por la Akt.

Por otro lado, la leptina está implicada en el proceso aterogénico al favorecer la agregación plaquetaria y la trombosis; la producción de citocinas inflamatorias, como el TNF- α , la IL-6, y la IL-12; promover el crecimiento de neointima; estimular la producción mitocondrial de aniones superóxido en las células endoteliales de aorta; y la calcificación de las células del músculo liso vascular (Kougias y cols., 2005).

OBJETIVOS CONCRETOS

El objetivo de este capítulo es estudiar la relación entre la leptina periadventicia y la función vascular en hipertensión. Para ello se caracterizaran los siguientes aspectos:

1. Cuantificación de la leptina plasmática y del tejido adiposo perivascular (periaortico y mesentérico) en ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad.
2. Cuantificación de la expresión génica de leptina en el tejido adiposo periaórtico, mesentérico y lumbar para:
 - El estudio de las diferencias regionales en la expresión génica de leptina dentro de la misma cepa.
 - El análisis del patrón de expresión de la leptina en los distintos tipos de tejido adiposo en hipertensión.
 - El estudio del efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica de leptina en el tejido adiposo periaórtico, mesentérico y lumbar.
3. Papel de la leptina en la reactividad vascular de la aorta y de la arteria mesentérica superior de estos animales.
4. Caracterización y cuantificación de los receptores de leptina de la aorta y del lecho vascular mesentérico de estos animales. Análisis de la vía de señalización del receptor Ob-Rb a través de la STAT-3.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cuantificación de la leptina plasmática y del tejido adiposo perivascular (periaórtico y mesentérico) en ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad

Para la determinación de la cantidad de leptina plasmática y perivascular se utilizaron las ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad (ver capítulo I) que fueron sacrificadas por decapitación. Las muestras de sangre fueron recogidas en EDTA y junto con las muestras de TA periaórtico y mesentérico se conservaron a -80°C hasta su utilización.

La concentración de leptina se determinó por enzimoimmunoensayo (ELISA) utilizando un kit comercial basado en la técnica directa tipo sandwich (TiterZime[®]EIA rat Leptin), con un límite de detección de 41,48 pg/ml. El % de variación intraensayo e interensayo fue del 5,6-13,9 y del 11,2-9,9, respectivamente, en función de la concentración de leptina. Las muestras de plasma se diluyeron en agua destilada. La disolución del plasma fue 1:5. Las muestras de TA mesentérico y periaórtico (300 mg aprox), se homogenizaron según el método de Russel y cols. Se diluyeron en 3-4 volúmenes de tampón de homogeneización (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Sacarosa 250 mM, con un pH de 7,4, inhibidores de proteasas: Leupeptina 2,5 $\mu\text{g/ml}$, Aprotinina 3,5 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 1mM y Triton X-100 al 1%, que favorece la extracción de leptina del tejido). La homogeneización se llevo a cabo en unos tubos de plástico duro, pequeños que introducimos en el homogenizador (Ultra-turrax) 30 seg, 15 seg en el hielo y otros 30 seg en el homogenizador. Una vez homogeneizado el tejido se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C para separar la capa de grasa. Seguidamente se recogió el sobrenadante, en el cual se determinó la cantidad de leptina.

La determinación se realizó en una placa de 96 pocillos tapizados con el antisuero primario anti-leptina. Se utilizaron 100 μl de cada muestra. Después de una incubación de 1 hora a 37°C se lavó la placa 7 veces con tampón de lavado, y se volvió a incubar durante 30 min a 37°C con 100 μl de antisuero anti-leptina conjugado con peroxidasa. Posteriormente, se lavó la placa 9 veces con tampón de lavado, y se incubó con 100 μl del sustrato de la peroxidasa durante 30 min. La reacción se detuvo con H_2SO_4 1 M. La placa se leyó a 450 nm en un lector de placas (Asys Hitech). La curva de calibración se preparó con las siguientes concentraciones de leptina: 3600, 1800,

900, 450, 225, 113 y 56 pg/ml. Los resultados fueron expresados en ng de leptina/ml de plasma y ng de leptina/mg de proteínas en el caso de los tejidos adiposos.

2. Papel de la leptina en la reactividad vascular de la aorta y de la arteria mesentérica de estos animales

2.1 Extracción de órganos y reactividad vascular

Una vez expuesta la cavidad abdominal se disecó la arteria mesentérica superior en su unión con la aorta abdominal. A continuación, se abrió la cavidad torácica y se disecó la aorta. Tanto la aorta como la arteria mesentérica superior, una vez eliminado el TA perivascular se dividieron en segmentos de 3 mm de longitud y se sumergieron en una solución de KH con dexametasona (8×10^{-7} M) para inhibir la inducción de la enzima iNOS y se mantuvieron a 4° C hasta su utilización en el baño de órganos.

Para registrar las variaciones de tensión isométrica de los segmentos vasculares se utilizó un sistema que se representa esquemáticamente en la Figura 35, y que se basa en la técnica descrita por Nielsen y Owman (1971). A través de la luz del segmento arterial se introdujeron dos alambres de acero rígido de 300 μ m de diámetro para los segmentos de aorta y 189 μ m de diámetro para los segmentos de la arteria mesentérica superior. Uno de ellos se fija a la pared de un baño que contiene 1 ml de solución KH. El otro alambre, que se desplaza paralelamente al anterior, se conecta con un transductor de fuerza (Piodem controls LTD. Dynamometer. Cibertec SA. España). El transductor se conecta, a su vez, a un amplificador y a un sistema de adquisición de datos MacLab/8e con el programa Chart & Scope v5 (ADInstruments) donde se registraron los cambios de tensión producidos en la pared del segmento arterial. La temperatura del baño se mantuvo constante a 37° C, mediante una doble pared por donde circula agua procedente de un termocirculador (Techna TE1 Tempeltef). Cada baño de órganos posee una entrada de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) necesario para oxigenar de forma adecuada las preparaciones y mantener un pH fisiológico constante (7,3-7,4).

Mediante un tornillo micrométrico se aplicó a cada segmento una tensión inicial de 1,5 g para las aortas y de 1g para las arterias mesentéricas. En experimentos preliminares se había demostrado que en estas condiciones se producía la máxima

respuesta a la administración de KCl 75 mM, considerándose 1,5 g y 1g la tensión óptima en cada una de las arterias. La tensión se fue reajustando periódicamente cada 15 min durante un periodo de 60 a 90 min, y cambiando al mismo tiempo el líquido nutritivo hasta lograr su completa estabilización.

Una vez estabilizadas las preparaciones, se les administró una solución despolarizante de KCl (75 mM) durante 20 min para comprobar su integridad funcional. Tras 30 min de lavado se repitió la administración de KCl.

Para comprobar la funcionalidad del endotelio, se realizó una curva concentración-respuesta a Ach (10^{-9} - 10^{-5} M) en segmentos arteriales precontraídos con NA 10^{-6} M. Aquellos segmentos arteriales que relajaban menos del 60% fueron descartados.

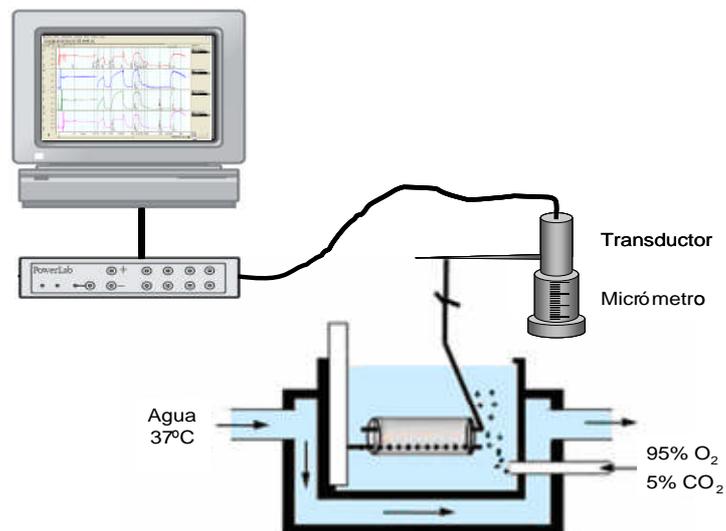


Figura 35: Representación esquemática del modelo experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica.

2.2 Respuesta vascular de la aorta y de la arteria mesentérica superior a leptina exógena

Con el fin de analizar si el efecto de la leptina es cuantitativamente distinto entre WKY y SHR, se estudió la reactividad a leptina exógena en segmentos de arteria mesentérica y aorta de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad.

Posteriormente, se administraron tres dosis de leptina exógena (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} M) en los vasos precontraídos con el análogo del TXA₂, U46691 (10^{-8} M). Este compuesto produce una contracción muy estable, idónea para generar el tono activo

necesario para poder observar una respuesta vasodilatadora. El tiempo de incubación de la leptina fue de 20 min.

Las diluciones de leptina se realizaron en salino al 0,9 % a partir de una solución con una concentración de 1mg/ml de leptina exógena preparada con NaOH 7,5 mM y HCl 15mM.

Además, se comprobó que el vehículo en el que iba disuelta la leptina no producía ningún efecto vascular. Así como si el efecto de la leptina era dependiente de la presencia de endotelio. Para ello, en determinados segmentos arteriales se eliminó el endotelio con un hilo de algodón, introduciéndolo varias veces, a través de la luz del vaso sin dañar la pared vascular (ni el músculo liso, ni la adventicia). Se confirmó la capacidad contráctil del músculo liso vascular de estos segmentos arteriales con KCl 75 mM y la ausencia de endotelio, al no producirse relajación a Ach.

3. Caracterización y cuantificación de los receptores de leptina de la aorta y del lecho vascular mesentérico de estos animales mediante western blot

Para la cuantificación de la expresión de los receptores de leptina, Ob-Ra y Ob-Rb en la aorta de WKY y SHR, se empleó la técnica de western blot.

Mediante la técnica del western blot, las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana. En western blot se emplea el sistema de inmunodetección indirecta. En este método se emplea un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés y un segundo anticuerpo, contra la especie en la que se ha producido el anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario se encuentra normalmente marcado con un enzima y por lo tanto sirve para localizar donde se han formado los complejos antígeno-anticuerpo.

3.1 Preparación de las muestras

Una vez diseccionada la aorta se homogeneizó utilizando un tampón de lisis: Tris-HCl (20 mM), KCl (100 mM), NaCl (5 mM), EDTA (2 mM), EGTA (1 mM), TLCK (1 µg/ml), FNa (5 mM), Na₂MoO₄ (1 mM), NaVO₄ (1 mM), DTT (2 mM), Na₄P₂O₇ (1mM), inhibidores de proteasas (aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml,

PMSF 10 mM) y Nonidet (0,5%) en el caso de la aorta o sacarosa (250 mM) en el caso del mesenterio.

La homogenización se realizó en un mortero de porcelana en el que se añadió N₂ líquido para facilitar dicha homogenización e impedir que las muestras se descongelasen. Una vez homogeneizadas las muestras se les añadió tampón de homogenización (300 µl de tampón de homogenización/50 mg de tejido) y se sometieron a choque térmico mediante congelación en N₂ líquido y descongelación en baño a 37° C, repitiendo el proceso tres veces. Seguidamente se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min a 4° C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante en el cual se determinó la cantidad de proteínas.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se hizo siguiendo el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Método basado en la absorbancia máxima que alcanza una solución acidificada por azul brillante de Comassie G-250, que cambia su longitud de onda de emisión de 465 nm a 592 nm, cuando se une a los grupos amino libres de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) de las proteínas.

Se realizó tomando 50 µl de muestra (diluciones 1:100 y 1:1000) y 200 µl de reactivo Bradford. Transcurridos 5 min se determinó la cantidad de proteína por lectura de la absorbancia a 592 nm.

Una vez que se determinó la concentración de proteínas las muestras se ajustaron a una concentración de 2,5 mg/ml de proteínas con el tampón de homogenización. A cada muestra se le añadió la misma cantidad del reactivo de Laemli (5x) (Tris 0.5M pH 6,8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol) en una proporción de 100 µl de Laemli/400 µl de muestra. El Laemli debe ser calentado previamente a 100° C durante 5 min. Este compuesto sirve para mejorar la conservación de las muestras y las tiñe para poder visualizarlas en el gel. Las muestras se conservaron a -20° C hasta la realización de los experimentos de western blot.

3.2 Preparación de los geles y electroforesis

Los geles que se emplearon (SDS/Poliacrilamida) se colocaron entre dos cristales dentro de un soporte de plástico (sistema Mini Protean 3 (Bio Rad)). Es muy

importante limpiar bien los cristales con etanol absoluto y dejarlos secar muy bien para que no afecte al desarrollo de la electroforesis.

En primer lugar, se debe determinar cual es el porcentaje más adecuado de acrilamida /bis-acrilamida que debe presentar el gel. En función del peso molecular de la proteína que se quiere determinar, el porcentaje de acrilamida /bis-acrilamida cambia. Para la determinación de las isoformas Ob-Rb y Ob-Ra, así como de la p-STAT3 y β -actina se utilizaron geles del 7%.

Para aumentar la resolución de estos geles es conveniente hacerlos discontinuos, es decir, se elaboró un gel de concentración y un gel de separación de proteínas. El gel de concentración posee un porcentaje bajo de acrilamida y un pH de 6,8, su misión es la de concentrar todas las proteínas en una banda lo más estrecha posible. El gel de separación separa las proteínas de la muestra y posee un pH de 8,8, el porcentaje de acrilamida de este gel dependerá de la proteína de interés que se quiera analizar.

En primer lugar se preparó el gel de separación (H_2O , Tris-HCl 1,5M, SDS 20%, acrilamida/bis-acrilamida, amonio persulfato 10%, TEMED). Esta solución se vertió entre los cristales hasta un poco más de la mitad de la altura y sobre esta se añadió agua destilada para aislar al gel del aire y favorecer la polimerización. Una vez polimerizado el gel (45 min) se eliminó el agua y se secó con un papel de filtro para poder añadir la solución del gel de concentración. Seguidamente se añadió la solución del gel de concentración o Stacking gel (H_2O , Tris-HCl 0,5M, SDS 20%, acrilamida/bis-acrilamida, amonio persulfato 10%, TEMED) y se colocaron los peines entre ambos cristales. El tiempo de polimerización de este gel es de 30 min. Transcurrido este tiempo se retiró el peine suavemente y se comprobó que los pocillos del gel, en los cuales se depositaran las muestras, se han formado correctamente. Previamente a la carga de las muestras, se colocaron los cristales en el soporte correspondiente dentro de la cubeta de electroforesis y se rellenaron con tampón de electroforesis 1x a 4° C, cuya composición fue la siguiente: glicina 0,2 M, Tris 0,025 M y SDS 0,1%.

Las muestras junto con el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™, All blue standards, BIO-RAD) se calentaron a 100° C durante 5 min, se agitaron y se cargaron en gel. En todos los pocillos se cargó la misma cantidad de proteína (16 μ l, ~ 40 picog de proteína) para poder realizar después el estudio comparativo.

A continuación, las proteínas se sometieron a un campo eléctrico migrando según su tamaño y/o carga y conformación. Los factores que determinan la separación de las proteínas son el porcentaje de acrilamida utilizado, la intensidad del campo eléctrico impuesto, el buen estado de todos los componentes del gel y el tamaño de los mismos, la carga neta y la conformación de las proteínas objeto de estudio.

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes a 200 V durante 45 min y temperatura ambiente, en presencia del detergente: dodecil sulfato sódico (SDS). Este compuesto presenta carga negativa y se une proporcionalmente al peso molecular de las proteínas independientemente de su secuencia. Con ello se consigue que las proteínas se separen en función de su peso molecular, adquiriendo todas ellas una carga negativa neta.

3.3 Transferencia de las proteínas a un soporte sólido

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas de un gel de electroforesis sobre membranas sintéticas.

Una vez finalizada la electroforesis, se comenzó con la transferencia de las proteínas a una membrana hidrofóbica de polivinilideno difluoro (PVDF) de diámetro de poro de 0,45 μm (Amersham, Reino Unido). Las membranas son hidrofóbicas y requieren un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas. Los geles se montaron en un sistema "sandwich" (Figura 36). Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en una cubeta en la que se encuentra una solución salina (tampón de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que la membrana quede hacia el ánodo.

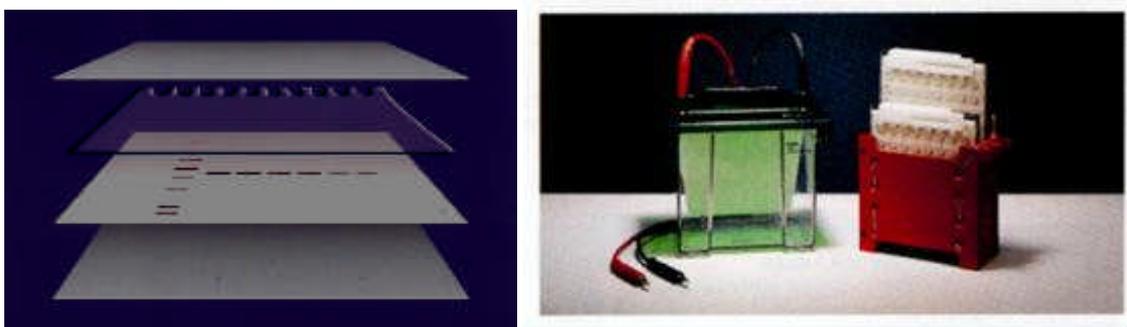


Figura 36: Esquema de la transferencia de proteínas por western blot

La transferencia se realizó a 400 mA durante 60 min en tampón de transferencia (glicina 0,2 M, Tris 0,025 M, SDS 0,1% y metanol al 20%) en frío y agitación.

El tampón de transferencia debe mantenerse en frío (4° C) hasta el momento de su utilización. Los estropajos y filtros empleados para hacer el sistema “sandwich”, se introducen en el tampón de transferencia, para así mantenerse húmedos y frescos.

3.4 Bloqueo de los sitios inespecíficos e incubación con el anticuerpo primario

Es necesario el bloqueo de sitios inespecíficos de unión del anticuerpo a la membrana. Para ello, una vez completada la transferencia, se lavaron las membranas (2 veces, 5 min cada lavado y agitación) con una solución de lavado: leche en polvo desnatada al 0,1% en tampón fosfato salino con Tween 20 (PBS-Tween) al 0,05%, y se procedió a bloquear la membrana, con una solución de bloqueo: leche en polvo desnatada al 5% en PBS-Tween, durante 60 min a temperatura ambiente y agitación. A continuación, se volvieron a lavar las membranas con la solución de lavado (3 veces, 10 min cada lavado y agitación) y se incubaron las membranas con el anticuerpo primario monoclonal de conejo contra el receptor de leptina (1:2000) (PA-1053, Affinity Bioreagents, EE.UU) durante toda la noche a 4° C y agitación. La solución del anticuerpo primario fue preparada en azida y su composición fue la siguiente: BSA al 0,5%, PBS-Tween y azida al 0,05%.

3.5 Incubación con el anticuerpo secundario

Los anticuerpos secundarios reconocen a los anticuerpos primarios según el animal donde estos últimos han sido obtenidos y están acoplados a diversas actividades enzimáticas que permiten detectar su interacción con los anticuerpos primarios.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con la solución de lavado y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente y agitación, con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo (leptina) (1:8000) marcado con peroxidasa, que se preparó en una solución al 1% en PBS-Tween.

3.6 Revelado

Tras lavar las membranas varias veces se procedió al revelado de las mismas, que se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia con el Luminol/ECL (Amershan, Reino Unido). El ester de acridinio reacciona con la peroxidasa del

anticuerpo secundario en condiciones ligeramente alcalinas, originando una reacción enzimática colorimétrica que produce luz de emisión muy intensa y de larga duración. La emisión de luz impresiona la película autorradiográfica, donde se puede observar la reacción de los anticuerpos con la proteína objeto de estudio. Para ello, las membranas se cubrieron durante 5 min con la mezcla de detección en las proporciones recomendadas por el fabricante. A continuación, las membranas se pusieron en contacto con las películas fotográficas (Kodak X-OMAT / Amershan Internacional, Alemania) en las que quedaron impregnadas las bandas que posteriormente se densitometraron. (Figura 37).

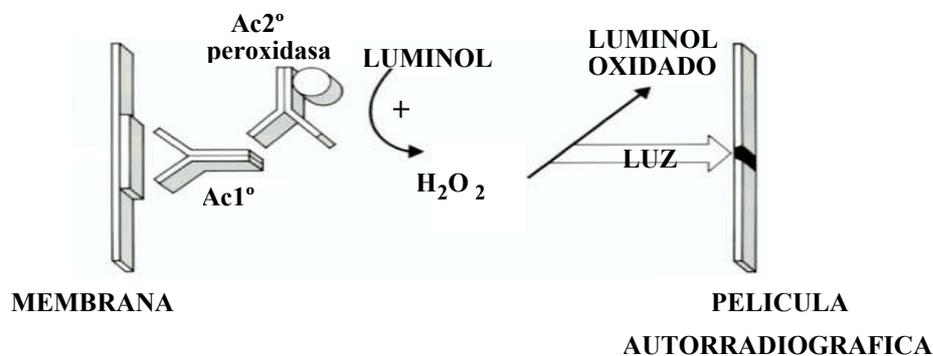


Figura 37: Esquema de detección por quimioluminiscencia en western blot.

Para la cuantificación de las dos bandas correspondientes a las dos isoformas del receptor de leptina, las bandas obtenidas por western blot se sometieron a una densitometría utilizando un programa informático Quantity One (Windows Software for Bio-Rad's Image Analysis System). Las mismas membranas fueron utilizadas para determinar la expresión de β -actina, que fueron utilizadas como control de carga y de esta forma corregir la expresión del receptor de leptina para cada muestra. Se utilizó para ello un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti β -actina (1:1500) (Sigma, EE UU) y como anticuerpo secundario IgG anti-ratón (1:10000) marcado con peroxidasa.

3.7 Estudio de la vía de señalización del receptor Ob-Rb a través de la STAT-3 en homogenizados de aorta

Para llevar a cabo la determinación de las proteínas STAT3 y p-STAT3 se utilizaron las mismas muestras de aorta empleadas en la determinación de los receptores de leptina y muestras procedentes de aorta de ratas macho WKY y SHR de 12 semanas

de edad, que fueron previamente tratadas con leptina aguda (i.p. 0,1mg/ml leptina, volumen inyección: 1 ml/kg rata) o vehículo (n: 24). Dos horas después de la administración de leptina, los animales fueron sacrificados mediante decapitación y se extrajo la aorta torácica que se procesó tal y como se indicó en el punto 3.1.

En los experimentos de western blot se empleó como anticuerpo primario monoclonal de ratón contra la proteína p-STAT3 (Tyr⁷⁰⁵) (1:1000) (Cell signaling Technology) y como anticuerpo secundario el IgG anti-ratón (p-STAT3) (1:10000) (Amersham) marcado con peroxidasa, que se preparó en una solución al 1% en PBS-Tween.

Las mismas membranas se utilizaron para determinar la expresión de la proteína STAT3, que se empleó como control de la expresión de la p-STAT3 para cada muestra. Se utilizó para ello un anticuerpo primario monoclonal de conejo anti STAT3 (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) y como anticuerpo secundario IgG anti-conejo (1:8000) (Amersham Bioscience, Reino Unido), marcado con peroxidasa. Se utilizó también como control de carga la β -actina, para ello se empleó como anticuerpo primario monoclonal de ratón anti β -actina (1:1500) (Sigma, EE UU) y como anticuerpo secundario IgG anti-ratón (1:10000) marcado con peroxidasa.

4. Cuantificación de la expresión génica de leptina en el tejido adiposo periaórtico, mesentérico y lumbar por RT- (Taqman) PCR

En la actualidad hay dos formas de detectar en tiempo real los productos de PCR, el primero es por medio del uso de SYBGreen (Molecular Probes), un marcador fluorescente que se une específicamente al ADN de doble cadena. El segundo es por el uso de distintas clases de sondas que hibridan sobre la cadena de ADN que se está amplificando emitiendo en ese momento fluorescencia. Entre estas últimas destacan las sondas de hidrólisis (Taqman assay de Applied Biosystems). La sonda específica se añade a la reacción de PCR convencional y la emisión de fluorescencia depende directamente de la síntesis del nuevo ADN. La fluorescencia emitida es recogida a través de una fibra óptica y leída por un láser.

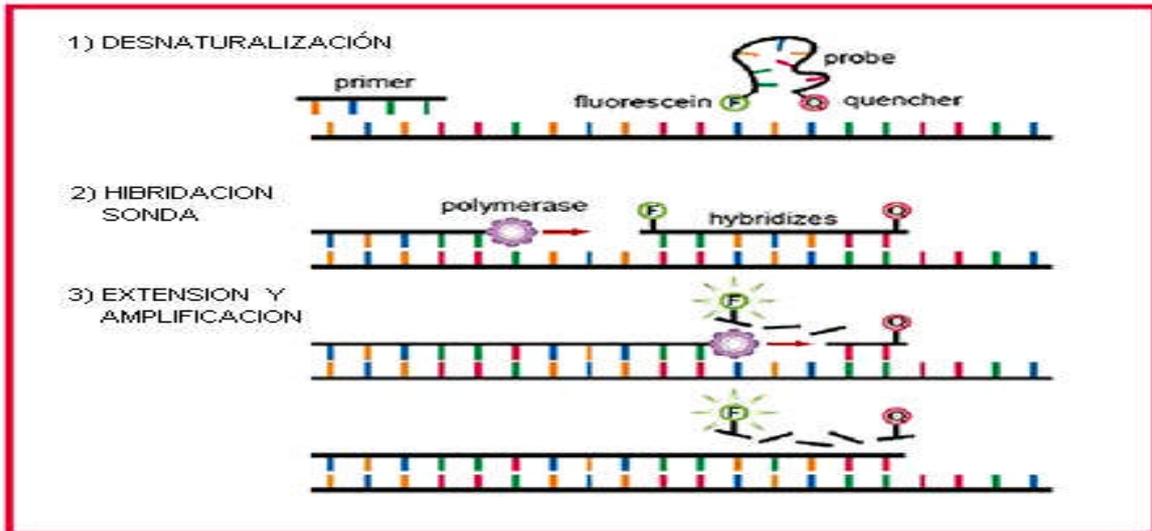


Figura 38: Esquema del proceso de la Real Time (Taqman) PCR. Copyright 2005, TAKARA MIRUS BIO INC.

Una de las ventajas más importantes de esta técnica es que permite el análisis en tiempo real del proceso de amplificación obteniendo se una “fase logarítmica lineal”. Durante esta fase, la cuantificación de los productos es más precisa, por lo que se utiliza para el análisis de los resultados. El inicio de esta “fase logarítmica lineal” se produce en cada PCR a partir de un número de ciclo diferente (que dependerá de la cantidad inicial de molde) y es a partir de este momento, cuando la señal fluorescente puede ser distinguida sobre el fondo o background.

El programa utilizado (ABI TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) analiza los datos obtenidos y los dispone en un diagrama en el que en el eje de las ordenadas se disponen los ciclos de amplificación a los que se ha sometido a la muestra y en abcisas aparecen el logaritmo de la concentración del producto de amplificación (Figura 39).

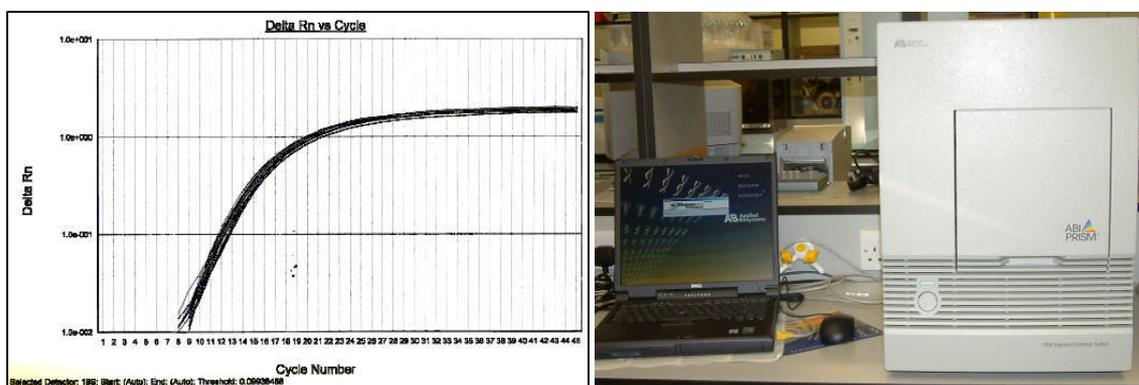


Figura 39: Ejemplo del diagrama de resultados e imagen del equipo de la RT- (Taqman) PCR.

Los productos de amplificación de la PCR incrementan de forma logarítmica en los primeros ciclos en los cuales se produce la amplificación antes de llegar a la fase de meseta de la fase logarítmica lineal. Por ello, se debe elegir para el análisis de los experimentos, estos primeros ciclos de la fase logarítmica lineal y determinar el punto más idóneo (Ct) en el cual comienza la fase exponencial de la amplificación. A este punto le corresponderá un determinado número de copias. La determinación de este Ct, nos proporcionará la información precisa acerca de la concentración inicial de la molécula que queremos analizar. Es muy importante que este punto sea el mismo para cada gen objeto de estudio en todas las muestras analizadas.

En el desarrollo de la PCR cuantitativa es muy importante la utilización de un control normalizador interno que evite los pequeños errores de manipulación del ADN copia (ADNc) generado en la transcripción inversa. Esta técnica es muy sensible y cualquier error de pipeteo podría ser detectado, para evitar este problema, se utilizaron estos controles internos positivos y cada muestra se normalizó por su control.

La elección del control normalizador es un aspecto determinante, y su expresión en el tejido que estemos estudiando no debe modificarse en los grupos experimentales objeto de estudio.

4.1 Procesamiento de las muestras y extracción del ARN total

Las muestras que se emplearon en este estudio fueron el TA periaórtico, mesentérico y lumbar de ratas macho WKY y SHR de 12 semanas de edad, que se trataron con leptina aguda (i.p. 0,1 mg/ml leptina, volumen inyección: 1 ml/kg rata) o vehículo (n: 24). Dos horas después de la administración de leptina, los animales se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los tejidos adiposos que inmediatamente se conservaron a -80° C.

Para la extracción del ARN total de estos tejidos adiposos (n: 72) se utilizó el kit de RNeasy Lipid tissue (QIAGEN® GmbH, Alemania). Se partió de 60 mg de TA periaórtico y mesentérico y 100 mg de TA lumbar, a los que se añadió el reactivo de lisis QIAzol (1ml de reactivo/100 mg de tejido) y se homogenizó durante 20-40 seg en un homogenizador (Ultra-turrax). Para favorecer la extracción de ARN se dejaron reposar las muestras durante 5 min a temperatura ambiente. Para separar el ADN y las proteínas del ARN, se añadió 200 µl de cloroformo, se agitó durante 15 seg y se volvió

a dejar reposar durante 2-3 min. Tras este periodo, se observó como se formaron dos fases, una orgánica en el fondo del vial, que contenía al ADN y las proteínas y otra fase acuosa por encima de la fase orgánica, que contenía el ARN. Para mejorar la separación de ambas fases, se centrifugó a 12000 g y 4° C durante 15 min. A continuación, se recogió en otro vial la fase acuosa, con cuidado de no arrastrar restos de la fase orgánica y se añadió el mismo volumen de etanol al 70% que de fase acuosa. Se mezcló en vortex y añadió 700 µl de esta solución a la columna (*RNeasy Spin Column*) en cuya membrana quedará adsorbido el ARN. Se volvió a centrifugar durante 15 seg, se eliminó el filtrado y se repitió este mismo paso las veces necesarias para pasar toda la solución del ARN por la columna. Se incluyó un paso de digestión de ADN (*RNase-Free DNase Set* (QIAGEN® GmbH, Alemania)) al protocolo, para minimizar la contaminación genómica. Para ello, se pipetearon 350 µl de tampón RW1 en la columna y se centrifugó a 10.000 rpm 15 seg. Se desechó el filtrado y se añadió 10 µl de la solución madre de DNasa I más 70 µl de tampón RDD en la columna, y se dejó a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se pipetearon otros 350µl de tampón RW1 en la columna y se centrifugó a 10.000 rpm 15 seg. Se desechó el filtrado.

Después de realizar la digestión del ADN, se realizaron un par de lavados del ARN con los tampones RW1 y RPE. Para ello, se añadieron a la columna 700 µl del tampón RW1, se centrifugó a 10.000 rpm y temperatura ambiente durante 15 seg y se eliminó el filtrado. Se colocó la columna sobre un nuevo tubo colector, se añadieron 500 µl del tampón RPE y se centrifugó a 10.000 rpm y temperatura ambiente durante 15 seg. Se desechó el filtrado y se añadieron nuevamente otros 500 µl del tampón RPE. Se volvió a centrifugar a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min y tras la eliminación del filtrado se centrifugó a la máxima velocidad durante 1 min.

Para eludir el ARN, se tiró el tubo colector de la columna y se colocó sobre un vial, cuidadosamente sobre la membrana de la columna, se añadieron 40 µl de agua libre de ARNasas, se dejó 1min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm durante 1 min. Tras la centrifugación, se tomó una muestra del ARN para seguidamente determinar la cantidad y calidad del ARN extraído y el resto del ARN se conservó a -80° C.

El ARN se analizó espectrofotométricamente, determinando se la absorbancia a 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración que tenemos de

ARN y la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm nos da una estimación de la calidad/pureza de ese ARN, considerándose que una relación superior a 1,8 indica un grado de pureza adecuado.

La calidad/pureza del ARN extraído se confirmó también en gel de agarosa al 1 %, en el cual se pipetearon 15 μ l de muestra: 10 μ l de una dilución 1:25 del ARN y 5 μ l de Ficoll. En el gel se obtuvieron dos bandas correspondientes a las subunidades 18S y 28S del ribosoma, dichas bandas deben de ser nítidas, de lo contrario, sería indicativo de degradación del ARN (Figura 40).

La cuantificación del ARN es imprescindible para después poder ajustar la misma cantidad de ARN de partida en las diferentes muestras para la realización de la transcripción inversa.

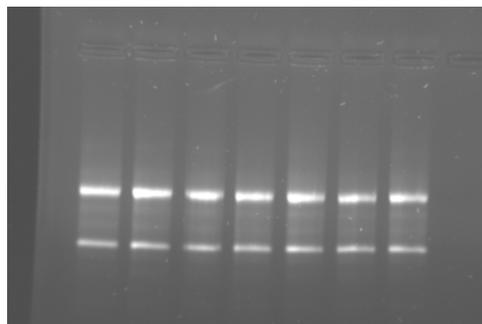


Figura 40: Confirmación en gel de agarosa al 1% de la calidad/pureza del ARN extraído

4.2 Transcripción inversa

Para la transcripción inversa se empleó el kit “First Strand cDNA Synthesis kit” (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania). Siguiendo el protocolo del kit, se partió de 1 μ g de ARN, y se obtuvo un volumen final de 40 μ l de ADNc, que se conservó a -20° C hasta su nuevo uso.

El ADNc obtenido se utilizó para la determinación de la expresión de los diferentes genes mediante una Real-Time (TaqMan) PCR cuantitativa.

4.3 Real-Time (TaqMan) PCR cuantitativa

Se empleó la RT-(Taqman) PCR para determinar los niveles de expresión del ARNm de la leptina en muestras de TAP, TAM, y TAL de ratas WKY y SHR, de 12 semanas de edad, control y tratadas con leptina aguda.

Los primers y las sondas fluorescentes que se emplearon fueron diseñados con el programa Primer Express[®] y se sintetizaron por TIB Molbiol (Berlín, Alemania), a partir del análisis de la secuencia que se pretende amplificar, que se obtuvo del banco de genes, Genebank. Deben contener, en lo posible, el mismo número de bases, evitando aquellas secuencias que poseen estructura secundaria. Además, no deben ser complementarios entre si en sus extremos 3', ni intramolecularmente. Esta preocupación disminuye la posibilidad de artefactos de la técnica.

Los TaqMan primers utilizados para el gen de la leptina y para los controles internos 18S y HPRT se detallan en la tabla 6. El 18S se empleó como control interno de las muestras de TAM y TAL y el HPRT como control interno de las muestras de TAP.

Gen	Primer directo	Primer reverso	Sonda
Leptina	5'-AACCCATCAAGACCATTGTCA-3'	5'-GGTCCATCTTGGACAAACTCAGA-3'	5'-CTTCATTCCTCCGGGCTTCACCCC-3'
18 S	5'-GGAGCCTGCGGCTTAATT-3'	5'-CAACTAAGAACGGCCATGCA-3'	5'-CAATCTGTCATCTGTCCGTGCCG-3'
HPRT	5'-CTCATGGACTGATTATGGACAGGACT-3'	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAC-3'	SYBGREEN

Tabla 6: TaqMan primers de 18S, HPRT, y leptina empleados en la RT- (Taqman) PCR.

Para evitar señales de origen genómico, se realizó una PCR (60° C, 40 ciclos y un volumen final de 25 µl) con una muestra de agua (para comprobar posible contaminación), una muestra de genoma y una muestra de cada TA empleando, por un lado, con los Standard primers y por otro, con los TaqMan primers. Después, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (al 1% para los Standard primers y al 3% para los TaqMan primers), para confirmar si los primers elegidos eran los idóneos y determinar si ese gen, en cuestión, se expresaba en nuestros tejidos adiposos. La especificidad del producto de la PCR fue confirmada por secuenciación (ExoSAP-IT[®], USB Corporation, Ohio, USA).

Para la cuantificación del número de copias de un gen presentes en nuestras muestras se debe de elaborar una curva patrón para cada gen y controles internos utilizados. Para ello, se realizó otra PCR con los Standard primers de ese gen o control interno en concreto, una muestra de agua y una muestra de ADNc de TA, pero con un volumen final mayor, de 75-100 µl. El producto de la PCR, se purificó utilizando un kit para purificación de fragmentos de ADN procedentes de PCRs (QIAquick PCR

Purification Kit (QIAGEN[®] GmbH, Alemania)) o un kit para extracción y purificación de ADN de geles de agarosa (QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN[®] GmbH, Alemania)) en el caso, de obtener más de una banda en el gel para un mismo gen. Este ADNc purificado se utilizó como estándar cero para nuestra curva patrón del gen o control interno en cuestión. Siete diluciones seriadas (1:10) de este estándar cero completan la curva patrón (Figura 41).

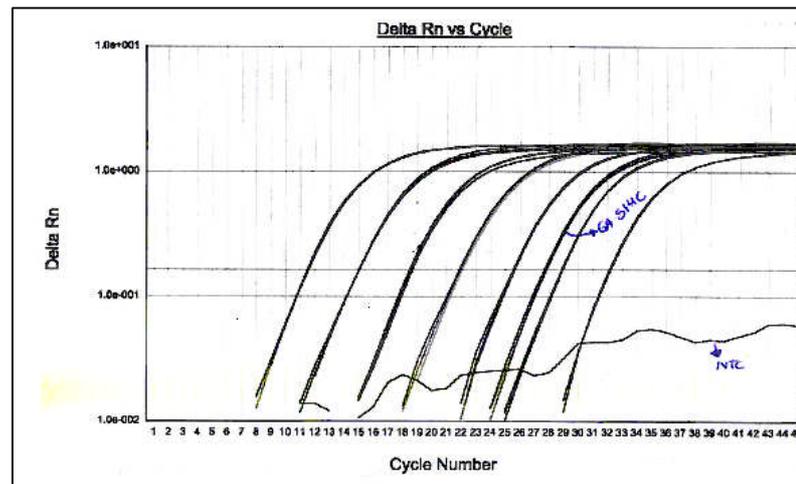


Figura 41: Ejemplo curva patrón para cuantificación en RT- (TaqMan) PCR.

Para la medida de la expresión génica se empleó el equipo de ABI PRISM[®] 7000 SDS junto con el ABI TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante.

La concentración final de los TaqMan primers y sonda fue de 300 nM y 100 nM, respectivamente, en un volumen final de 25 μ l. Todas las muestras se midieron por triplicado y los datos de expresión de cada muestra se normalizaron por su control interno.

5. Composición de las diferentes soluciones utilizadas

En las siguientes tablas se detalla la composición de las diferentes soluciones empleadas en la homogenización de los tejidos y en la técnica del western blot:

5.1 Solución empleada para la homogenización de los tejidos

TAMPÓN DE LISIS	
Aprotinina 10 µg/ml	NaVO ₄ 1 mM
EDTA 5 mM	Tris-HCl 50 mM (pH 7,6)
NaF 5mM	PMSF 2 mM
Leupeptina 1 µg/ml	TLCK 1 µg/ml
Na ₂ MoO ₄ 10mM	Nonidet P-40, 0,5% (aorta)
NaCl 150 mM	Sacarosa 250 mM (mesentérico)

5.2 Soluciones empleadas en la técnica de western blot

SOLUCIÓN LAEMMLI	GEL DE SEPARACIÓN	GEL DE CONCENTRACIÓN	TAMPÓN DE ELECTROFORESIS
β-Mercaptoetanol, 5%	Acilamida/Bisacilamida 7%	Acilamida/Bisacilamida	Glicina 0.2 M
Azul de bromofenol 0.01%	Persulfato amónico 10%	Persulfato amónico 10%	SDS 0.1%
Glicerol, 10%	TEMED	TEMED	Tris base 0.025 M
H ₂ O Destilada			
SDS 2%	SDS 20%	SDS 20%	
Tris-HCL 0.5 M pH 6.8	Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	Tris-HCL 0.5 M pH 6.8	

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA	SOLUCIÓN DE BLOQUEO	SOLUCIÓN DE LAVADO	SOLUCIÓN DE ANTICUERPO
Glicina 0.2 M	H ₂ O destilada	H ₂ O destilada	H ₂ O destilada
MeOH20%	Leche desnatada, 5%	Leche desnatada, 1%	Leche desnatada
SDS 0.1%	PBS 1X	PBS 1X	PBS 1X
Trisbase, 0.025 M	Tween20 0.05%	Tween 20 0.05%	Tween20 0.05%

6. Análisis estadístico

Los valores de los resultados obtenidos se expresaron mediante la media aritmética y el error estándar de la media aritmética (E.S). En todos los experimentos se indica el número de casos por grupo experimental.

En el análisis de las posibles diferencias entre distintos grupos experimentales se utilizó el programa estadístico StatView de Sas Institute Inc., versión 2002. Para comparar diferentes cepas y grupos de tratamiento las diferencias entre las medias se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de un postest (Fisher's). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Niveles plasmáticos de leptina en WKY y SHR de 12 semanas de edad

Los niveles de leptina en plasma fueron significativamente menores en SHR que en WKY (figura 42).

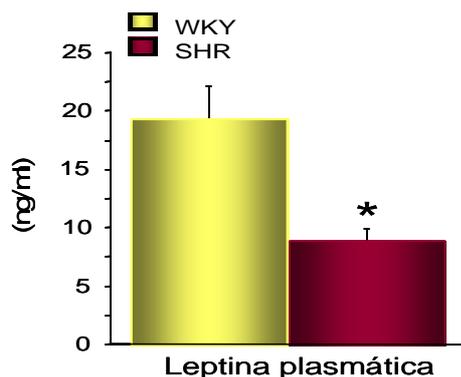


Figura 42: Niveles de leptina en plasma de WKY y SHR de 12 semanas de edad, determinados por ELISA. Los resultados están expresados en ng/ml. Cada resultado representa la media \pm E.S de 5-17 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

1.1 Correlación entre los niveles plasmáticos de leptina y la cantidad de tejido adiposo mesentérico de WKY y SHR

Debido a que los niveles plasmáticos de leptina están directamente relacionados con la cantidad de TA (Zhang y cols., 1994) se analizó si existía una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de leptina y la cantidad de TA mesentérico. Puesto que la cepa SHR presenta una menor cantidad de TA mesentérico se observó una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de leptina y la cantidad de TA mesentérico, en ambas cepas (Figura 43).

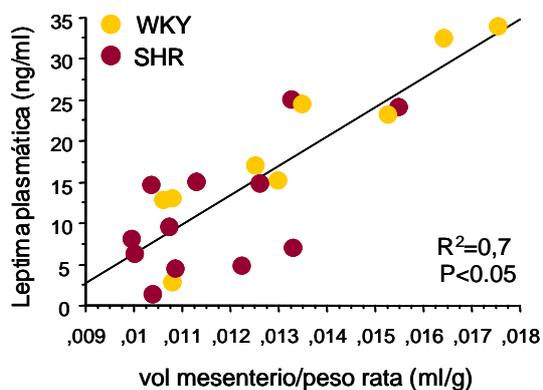


Figura 43: Correlación entre los niveles de leptina plasmáticos y la cantidad de TA mesentérico, expresado como volumen del mesenterio/peso del animal.

2. Niveles de leptina en el tejido adiposo periaórtico y tejido adiposo mesentérico de WKY y SHR

Al igual que en plasma los niveles de leptina en el tejido adiposo mesentérico fueron significativamente menores en SHR que en WKY (Figura 44A). Sin embargo, la concentración de leptina en el tejido adiposo periaórtico fue similar en ambas cepas (Figura 44B).

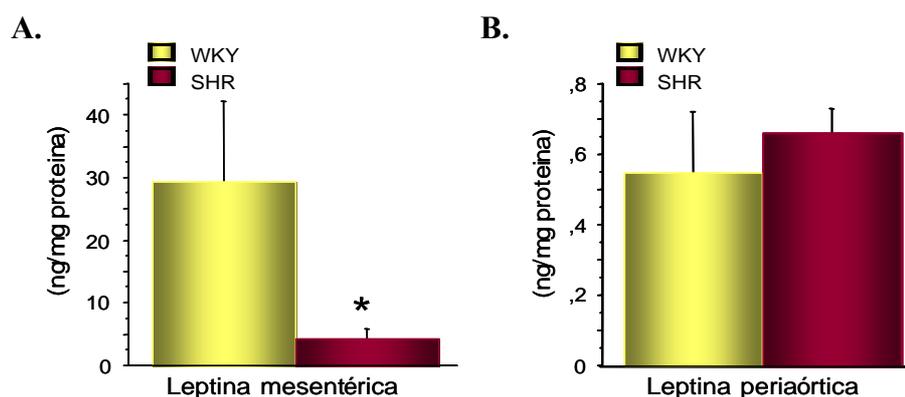


Figura 44: Niveles de leptina en el tejido adiposo mesentérico (A) y el tejido adiposo periaórtico (B) de WKY y SHR de 12 semanas de edad, determinados por ELISA. Los resultados están expresados en ng/mg de proteína. Cada resultado representa la media \pm E.S de 5-17 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

3. Estudio de las diferencias regionales en la expresión génica de leptina dentro de una misma cepa.

También se determinó la expresión génica de leptina en el TAP, TAM, y TAL de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad. Para determinar si existían diferencias regionales en la expresión génica de leptina dentro de una misma cepa, se compararon los niveles de expresión del ARNm de la leptina entre las muestras de los tres TA analizados.

En ambas cepas se encontró que la expresión de la leptina en el TAM era significativamente mayor que en el TAP (Figura 45A y B). Así mismo, la expresión de leptina en el TAL de WKY y SHR, fue significativamente mayor que en el TAP y en el TAM (Figura 45A y B). Por lo tanto, en ambas cepas la expresión del ARNm de la leptina es diferente dependiendo del tejido adiposo analizado, existiendo por consiguiente diferencias regionales en la expresión del ARNm de la leptina en WKY como en SHR.

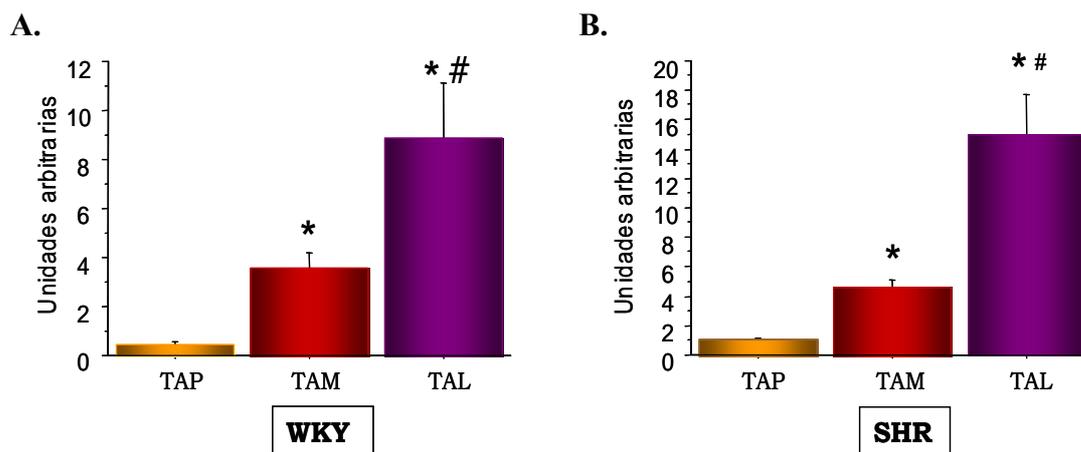


Figura 45: Expresión del ARNm de leptina en el TAP, TAM, TAL de WKY (A) y SHR (B) de 12 semanas de edad, determinado mediante RT-(Taqman)PCR. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 6 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs TAP y (#) estadísticamente significativo vs TAM $p < 0,05$.

3.1 Estudio de las diferencias de expresión génica de leptina en el tejido adiposo periaortico, meséntérico y lumbar entre WKY y SHR de 12 semanas de edad

Para determinar si la expresión génica de la leptina era diferente entre WKY y SHR dentro de un mismo tejido adiposo, se compararon los niveles del ARNm de la leptina de cada tejido adiposo entre WKY y SHR. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de leptina en el TAP fue significativamente mayor en la cepa SHR que en la cepa WKY (Figura 46A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas en los niveles del ARNm de la leptina del TAM, ni del TAL (figura 46B y C, respectivamente).

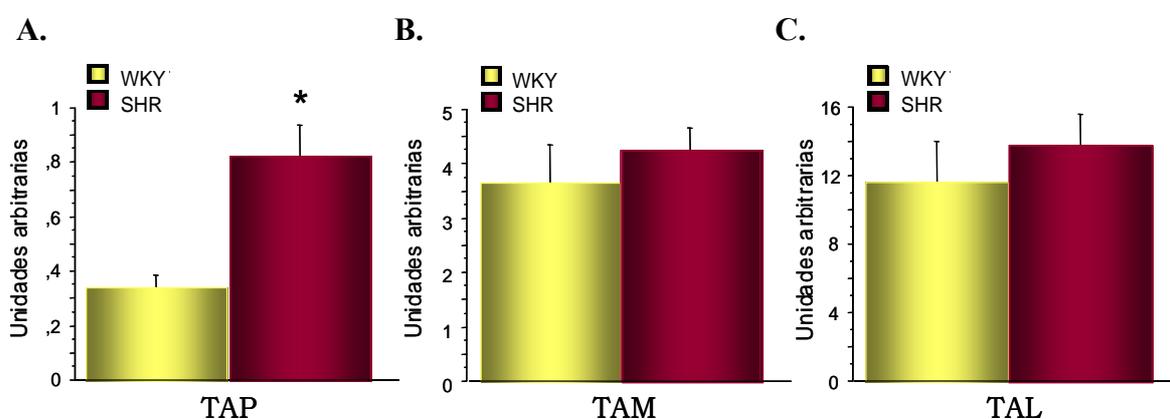


Figura 46: Comparación de la expresión del ARNm de leptina en el TAP (A), en el TAM (B) y en el TAL (C) entre WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno HPRT para el TAP y 18S para el TAM y el TAL. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

3.2 Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica de leptina en el tejido adiposo de WKY y SHR de 12 semanas de edad

Además, se analizó el efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión génica de leptina en el TAP, el TAM y el TAL, para ello, se compararon los niveles de expresión del ARNm de leptina de las muestras de tejido adiposo de los animales control con las de los animales tratados con leptina aguda.

El tratamiento agudo con leptina no modificó los niveles de expresión génica de la leptina en WKY ni en SHR, en ninguno de los TA (Figura 47). Los niveles del ARNm de leptina fueron estadísticamente similares en ambas cepas en las muestras control y en las de los animales tratados con leptina.

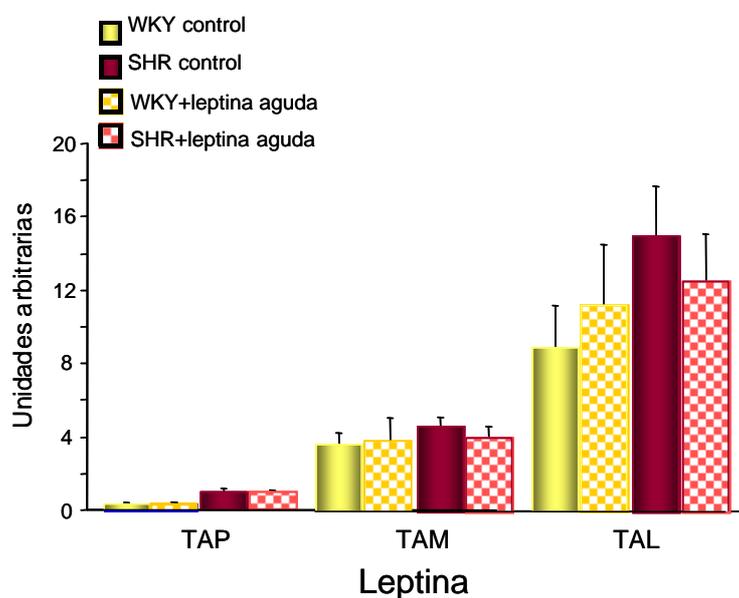


Figura 47: Efecto del tratamiento agudo con leptina sobre la expresión del ARNm de leptina en el TAP, TAM y TAL de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno HPRT para el TAP, y por el 18S para el TAM y el TAL. Los datos representan la media \pm E.S de 6 determinaciones/cepa.

4. Efecto de la leptina exógena sobre la función vascular de la aorta y de la arteria mesentérica de WKY y SHR

Se analizó el efecto vasodilatador de la leptina exógena en segmentos aórticos y en segmentos de la arteria mesentérica superior de WKY y SHR, precontraídos con U46619 (10^{-8} M) y cuya respuesta relajante a Ach fue superior al 60%. La leptina indujo una vasodilatación dependiente de la concentración en ambas cepas y en ambos lechos vasculares (Figura 48A y B, respectivamente). El efecto vasodilatador fue significativamente mayor en WKY que en SHR. Además, el efecto de la leptina fue dependiente de la presencia de endotelio, al comprobarse que la leptina no producía ningún efecto en los segmentos arteriales sin endotelio. También se confirmó que el vehículo (NaOH 7,5 mM y HCl 15mM) en el que iba disuelta la leptina no producía ningún efecto vascular.

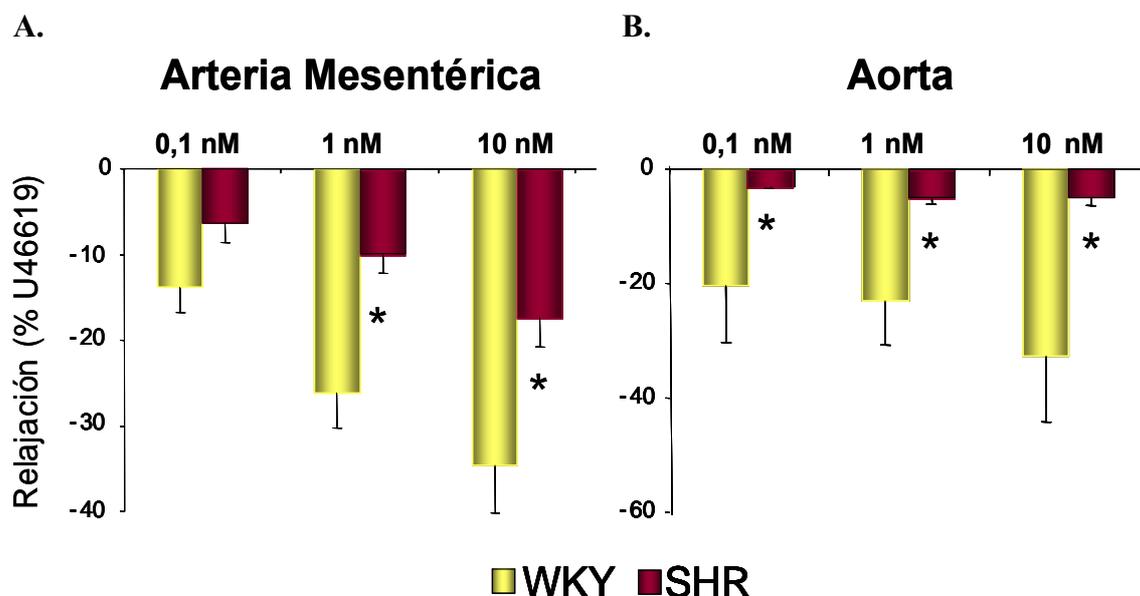


Figura 48: Curva concentración-respuesta a leptina exógena en segmentos de arteria mesentérica superior (A) y de aorta (B) de WKY y SHR de 12 semanas de edad precontraídos con U46619 (10^{-8} M). Los resultados están expresados como relajación en porcentaje de la contracción a U46619 (10^{-8} M). Los datos representan la media \pm E.S de 7 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

5. Cuantificación de los receptores de leptina: Ob-Rb y Ob-Ra mediante western blot en homogenizados de aorta de WKY y SHR de 12 semanas de edad

Para determinar si las diferencias encontradas entre WKY y SHR en el efecto vasodilatador de la leptina, eran debidas a una diferencia en el número de receptores de leptina, se cuantificó la expresión de las proteínas de Ob-Ra y Ob-Rb en los

homogenizados de aorta y tejido adiposo mesentérico de ambas cepas. Los experimentos de western blot revelaron la presencia de una banda a 125 KDa, compatible con el peso molecular del Ob-Rb y de una banda a 100 KDa correspondiente a la isoforma Ob-Ra (Figura 49A).

Los niveles de Ob-Rb fueron similares en las muestras de aorta de WKY y de SHR (Figura 49B). Sin embargo, la expresión de la forma corta del receptor de leptina, Ob-Ra, fue significativamente menor en la aorta de SHR que de WKY (Figura 49C).

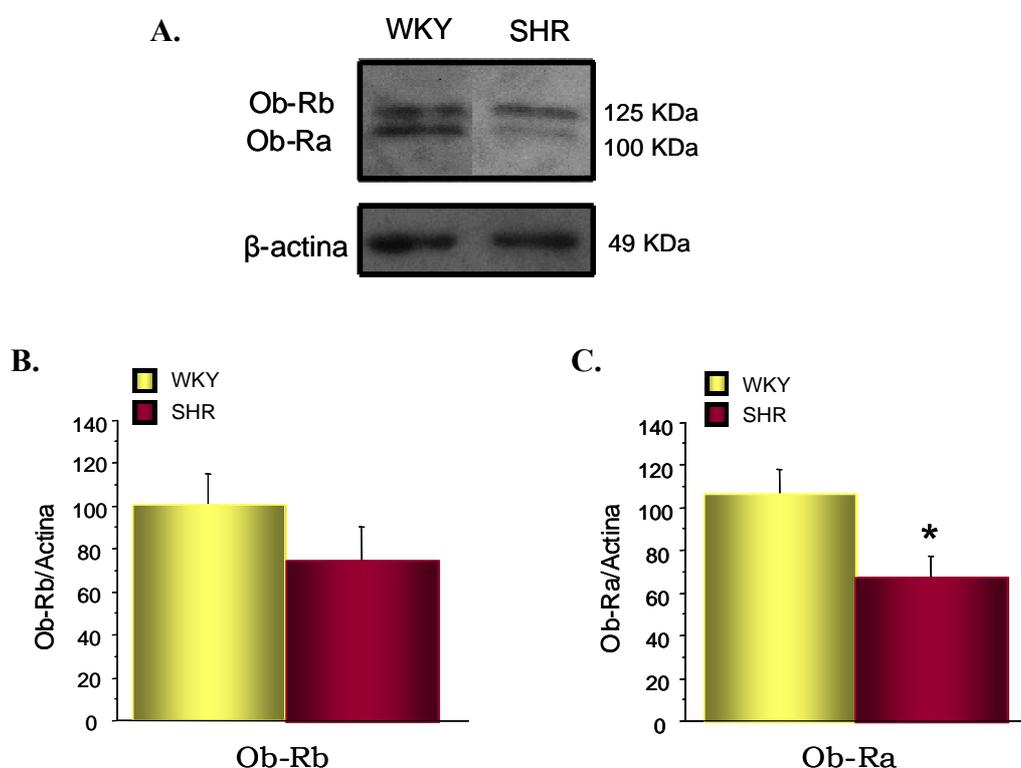


Figura 49: Expresión del receptor de leptina en la aorta de WKY y SHR de 12 semanas de edad. En la figura A se muestra un blot representativo de los experimentos realizados. La β -actina se utilizó en ambos casos como control de carga. Todas las muestras utilizadas fueron ajustadas a 2,5 mg/ml de proteína con reactivo de Laemli. En la figura B y C se muestra el análisis cuantitativo de las señales, correspondientes al Ob-Rb (B) y al Ob-Ra (C), ambos corregidos por su control de carga la β -actina. Los datos representan la media \pm E.S de 6 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

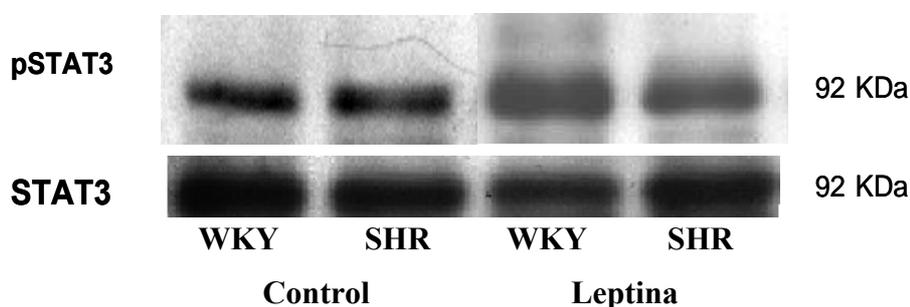
5.1 Detección de las proteínas STAT3 y pSTAT3 en respuesta a la estimulación aguda con leptina

Dado que la expresión del receptor Ob-Rb es similar en ambas cepas, se analizó el mecanismo de transducción de señal de este receptor a través de la STAT-3. Para ello

se determinó la fosforilación de la STAT3 en respuesta a la estimulación aguda con leptina.

La expresión basal de pSTAT3/STAT3 en aorta fue similar en WKY y SHR. La estimulación con leptina (100 µg/kg i.p.) produjo un incremento significativo de la expresión de pSTAT3/STAT3 a las dos horas de la administración de leptina, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambas cepas (Figura 50B). Esto sugiere que la fosforilación de la STAT3 en las aortas de WKY y SHR es similar.

A.



B.

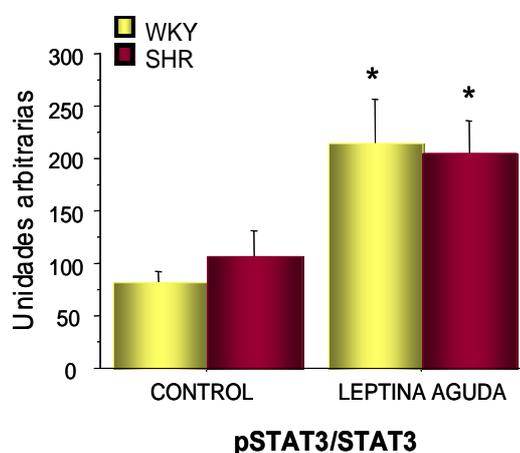


Figura 50: Determinación de las proteínas pSTAT3 y STAT3 en la aorta de WKY y SHR de 12 semanas de edad tratados con leptina aguda. En la figura A se muestra un blot representativo de los experimentos realizados. En la figura B se muestra el análisis cuantitativo de las señales, correspondientes a la expresión de la pSTAT3 en los animales control y en los animales tratados con leptina aguda, corregidos por su control de carga el STAT3. Los datos representan la media \pm E.S de 6-8 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la cepa SHR presenta unos niveles plasmáticos y mesentéricos significativamente inferiores a los de la cepa WKY. Además, los niveles plasmáticos de leptina correlacionan con la cantidad de tejido adiposo mesentérico, confirmando que los niveles circulantes de leptina se incrementan proporcionalmente con la adiposidad (Banks., 2004; Frühbeck., 1998 y 2001).

La leptina se secreta principalmente por el TA blanco y en menor medida por el TA marrón (Trayhurn y cols., 1999). Por este motivo, es lógico que la cepa SHR presente niveles inferiores de leptina en el TAM puesto que como ya comentamos (véase tabla 2, punto 1.2, Capítulo I) esta cepa presenta una menor cantidad de TAM que su control normotenso, a igualdad de peso corporal, y que los niveles de leptina en el TAP sean similares entre ambas cepas, al no existir entre ellas diferencias en la cantidad de este TAP.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores (Judy y cols., 1976), que encontraron niveles plasmáticos inferiores de leptina en ratas macho como en hembras de SHR en comparación con WKY (24 semanas de edad), que correlacionaban con la mayor hiperreactividad simpática presente en SHR. Sin embargo, como ya comentamos en el capítulo anterior, no se encontraron diferencias significativas en la actividad noradrenérgica del tejido adiposo lumbar de WKY y SHR.

Sin embargo, Rodríguez y cols., demostraron en 2006, que la cepa SHR presentaba niveles plasmáticos de leptina superiores a los de WKY. Estos resultados se explican porque en este trabajo la cepa SHR presenta un peso corporal significativamente mayor al de WKY, que no es el caso de nuestras cepas. De hecho, Hiraoka y cols, demostraron que la expresión del gen *ob* y la liberación de leptina estaba marcadamente incrementada en el TA blanco de las ratas obesas SHR (Koletsky) en comparación con su control normopeso SHR, indicando que la expresión del gen *ob* así como la liberación de leptina parecen estar más influenciados por la cantidad de grasa corporal.

También se han descrito niveles plasmáticos elevados de leptina tanto en pacientes como en roedores con HTA, probablemente por un incremento en la

liberación de leptina del tejido adiposo mesentérico y omental (Henriksen y cols., 2000).

Además, la expresión génica de leptina en el TAM y TAL fue similar en entre ambas cepas. Sin embargo, paradójicamente, aunque no hay diferencias entre las cepas en la cantidad de proteína en el TAP, la expresión génica de esta hormona fue significativamente mayor en la cepa SHR que en la WKY, lo cual puede ser debido a modificaciones post-transcripcionales.

Entre las múltiples funciones que ejerce la leptina parece que también contribuye a la homeostasis del tono vascular (Frühbeck, 1999, Lembo y cols., 2000; Vechhione y cols., 2002, Fortuño y cols., 2002). A través, de la activación del SNS produciría un aumento de la presión arterial (Frühbeck, 1999), mientras que el efecto vascular directo, sobre sus receptores presentes en la capa muscular (Fortuño y cols, 2002) y/o el endotelio vascular de arterias de conducción y de resistencia, sería vasodilatador (Frühbeck, 1999).

Para estudiar el efecto vasodilatador de la leptina se realizó una curva concentración-respuesta a leptina exógena (10^{-10} - 10^{-8} M) en segmentos aislados de aorta y de arteria mesentérica superior de WKY y SHR de 12 semanas de edad, precontractados con un análogo de TXA₂, el U46619. Los resultados obtenidos sugieren que el efecto vasodilatador mediado por la leptina en la aorta y en la arteria mesentérica superior, es dependiente de la concentración y de la presencia de endotelio. Además, la respuesta vasodilatadora inducida por la leptina fue significativamente menor en la cepa SHR que en la WKY en los dos lechos vasculares estudiados, a todas las concentraciones de leptina utilizadas, a excepción de la 10^{-10} M en el caso de las arterias mesentérica que indujo una vasodilatación similar entre ambas cepas.

Las diferencias en la relajación a leptina exógena entre WKY y SHR, no se deben a una disfunción endotelial puesto que tanto en el lecho vascular mesentérico (página 68) como en aorta (resultados no mostrados) no hubo diferencias en la respuesta relajante inducida por la Ach.

Para determinar si las diferencias encontradas en la respuesta vasodilatadora inducida por la leptina eran debidas a diferencias en el número de receptores de leptina, se cuantificó la presencia de las isoformas Ob-Ra y Ob-Rb en homogenizados de aorta.

Se encontró que la expresión de la forma larga del receptor de leptina, Ob-Rb era similar entre ambas cepas. Sin embargo, la expresión de la forma corta, Ob-Ra era significativamente menor en la cepa SHR.

Por el contrario, se han encontrado niveles proteicos del Ob-Ra y Ob-Rb significativamente superiores en cultivos de células musculares lisas de SHR en comparación con los encontrados en WKY (Rodríguez y cols., 2006). Nuestros resultados hacen referencia a homogenizados de la arteria aorta torácica en su totalidad (sin tejido adiposo perivascular) y no debemos olvidar que también se ha descrito la presencia de receptores de leptina en el endotelio vascular (Sierra-Honigmann y cols., 1998), lo cual puede explicar que nuestros resultados difieran de los obtenidos por Rodríguez y cols. Por otra parte, los resultados de Rodríguez y cols., son en células en cultivo en las cuales se han podido producir modificaciones fenotípicas en la expresión de receptores que no tienen por qué reflejar la situación *in vivo*.

Por lo tanto, la menor respuesta vasodilatadora mediada por la leptina exógena en la aorta torácica de SHR, no se debe a una disminución en el número de receptores Ob-Rb, considerado como la isoforma funcional receptor de leptina por su capacidad de activar la cascada de señalización JAK-STAT.

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si la vía de señalización de la JAK-STAT3 estaba alterada o disminuida en la cepa hipertensa. Por ello se determinó la fosforilación de la STAT3 en situación basal y en respuesta a la estimulación aguda con leptina (100 µg/kg intraperitoneal). Los resultados obtenidos indican que la expresión basal de pSTAT3/STAT3, como el incremento de la expresión de pSTAT3/STAT3 a las dos horas de la administración de leptina es similar en los homogenizados de aorta de ambas cepas. Por tanto, la menor respuesta vasodilatadora a leptina observada en SHR no se debe a una menor capacidad de señalización del receptor.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la cepa SHR posee menores niveles circulantes y mesentéricos de leptina. Además, los animales hipertensos son menos sensibles al efecto vasodilatador de leptina exógena. Todo ello, podría ser responsable de la elevada presión arterial encontrada en esta cepa. A su vez, esta menor respuesta relajante de la leptina no es debida a una disminución en el número de

receptores Ob-Rb, ni a una menor capacidad de activar la cascada de señalización de la STAT3.

Como posibles mecanismos que expliquen este menor efecto vasodilatador de la leptina exógena, actualmente estamos investigando si la menor presencia de receptores Ob-Ra, cuyo papel en el efecto vascular de la leptina se desconoce, podría tener alguna implicación.

CAPÍTULO III

Caracterización del sistema renina-angiotensina del tejido adiposo perivascular

INTRODUCCIÓN

I. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA)

El SRA juega un papel central en la regulación de la presión arterial mediante la regulación de la función renal y la modulación del tono y la estructura vascular.

El sustrato de este sistema es el angiotensinógeno (AGT): una α -glicoproteína que a través de la enzima renina se transforma en el decapeptido angiotensina I (Ang I), la cual a su vez es convertida en Ang II (octapeptido) por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

La degradación de la Ang II por aminopeptidasas lleva a la formación de la angiotensina III y angiotensina IV cuya actividad biológica es poco conocida, aunque parece ser que tienen acciones parecidas a la Ang II pero de menor intensidad.

El decapeptido de la Ang I es también sustrato del homólogo de la enzima convertidora de angiotensina, la ECA2, que convierte a la Ang I en angiotensina 1-9 (nonapeptido), que no tiene acción vascular, pero puede ser convertida por la ECA en angiotensina 1-7 (Tipnis y cols., 2000; Donoghue y cols., 2000).

La Ang I también puede ser convertida en angiotensina 1-7 por la acción de tres endopeptidasas: la propilendopeptidasa (E.C. 3.4.24.26) que se encuentra en el cerebro canino y en células vasculares de la aorta y venas umbilicales; la endopeptidasa neutra (E.C. 3.4.24.11) que actúa en la circulación; y la thimet-oligo-peptidasa (E.C. 3.4.24.15) que actúa en las células musculares lisas vasculares (Ferrario, 2006).

Las acciones de la Ang-(1-7) son principalmente vasodilatadoras y antitróficas: inhibe la síntesis proteica, amplifica el efecto vasodilatador de la bradiquinina y, probablemente, reduce la liberación de NA a través de un mecanismo mediado por la bradiquinina y el NO que estimula la señalización de GMPc/proteinkinasa G (Ferrario, 2006).

Es importante destacar que existen otras vías enzimáticas para la síntesis de la Ang II como la catepsina G, la tonina y el activador de plasminógeno tisular (t-PA), que tienen la capacidad de generarla directamente a partir del AGT (Weiss y cols., 2001; da Cunha y cols., 2005, Bush y cols, 2000), o las vías de la quimasa y la enzima generadora de Ang II «sensible a quimostatina» (CAGE), que tienen la capacidad de producir Ang II a partir de la Ang I y no requieren la presencia de la ECA (Bush y

cols., 2000; Ruiz-Ortega y cols., 2001). Aunque la relevancia fisiológica o fisiopatológica de estas vías de síntesis de Ang II está aún por esclarecer, recientemente se ha sugerido que la vía de la quimasa en el corazón y en la pared vascular podría tener importancia en las alteraciones funcionales y estructurales asociadas a hipertensión, aterosclerosis y diabetes (Perazella y cols., 2003).

La Ang II es el principal péptido efector del SRA. Media sus acciones biológicas a través de su unión a dos tipos de receptores de membrana, pertenecientes a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G, denominados AT₁ y AT₂. Estos dos subtipos de receptores poseen una estructura y localización diferente. Además, su regulación y expresión es específica del tejido (Paul y cols., 2006).

Además de éstos dos subtipos de receptores, existen otros dos receptores membranales para la Ang II: el receptor AT₃ y el receptor AT₄ también denominados receptores atípicos, los cuales son capaces de unir a la Ang II, y a sus productos: la Ang III y la Ang IV (Thomas y cols., 2003; Dinh y cols., 2001; Paul y cols., 2006).

El receptor AT₁ es el responsable de la mayoría de los efectos biológicos de la Ang II: vasoconstricción, estimulación de la síntesis y liberación de aldosterona, aumento en la retención de sodio y agua a nivel renal, proliferación celular, remodelado, aumento de la actividad noradrenérgica periférica, aumento de la actividad central del sistema nervioso simpático, estimulación de la liberación de vasopresina e inhibición de la renina renal. Dichas acciones, de una manera directa o indirecta, afectan a la homeostasis cardiovascular y participan en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal, etc.

Además, mediante la activación de los receptores AT₁, la Ang II aumenta la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno como los aniones superóxido, a través de actividades enzimáticas como la NAD(P)H oxidasa (Paravicini y cols., 2006; Ushio-Fukai y cols., 2005). Los aniones superóxido reaccionan con el óxido nítrico (NO) dando lugar a peroxinitrito (ONOO⁻), que es otro radical que participa en los procesos de daño celular (nitrosación de proteínas, peroxidación lipídica, alteración de los ácidos nucleicos y de la expresión génica) y altera la función endotelial (Munzel y cols., 1999, Paravicini y cols., 2006).

El papel fisiológico de los receptores AT₂ continúa siendo poco conocido. Se expresa altamente en los tejidos fetales, donde parece estar implicado en el desarrollo y diferenciación embrionaria. Después del nacimiento su expresión disminuye dramáticamente, siendo restringido a algunos órganos, incluyendo el sistema cardiovascular (Henrion y cols., 2001; Kaschina y Unger., 2003). En la etapa adulta los niveles de expresión de este receptor se incrementan bajo condiciones de estrés o de daño tisular (Escobar y cols., 2004).

Estudios recientes realizados en cultivos celulares y en segmentos arteriales aislados demuestran que la activación de los receptores AT₂ contrarrestan los efectos sobre la proliferación celular mediados por los receptores AT₁ (Zelezna y cols., 1999; Henrion y cols., 2001, Stoll y cols., 1995). Estos resultados incrementan las evidencias de la participación de los receptores AT₂ en el crecimiento, diferenciación y regeneración del tejido neuronal. (Paul y cols., 2006). Asimismo, la activación de los receptores AT₂ produce vasodilatación a través de la producción de NO (Henrion y cols., 2001, Zhang y cols., 2003, Siragy y cols., 1997, Somoza y cols., 2005, Wendy y cols., 2005).

Además, Abdalla y cols., demostraron que el receptor AT₂ puede antagonizar las acciones del receptor AT₁ al unirse directamente con él. Esta heterodimerización entre ambos receptores inhibe la señalización del receptor AT₁ independientemente de la activación del receptor AT₂ (Wendy y cols., 2005).

Por otro lado, en roedores se han identificado y clonado dos subtipos del receptor AT₁ que codifican por dos genes distintos (Iwai, y cols 1992; Sasamura, y cols., 1992) y se denominan AT_{1a} y AT_{1b}.

El receptor está altamente expresado en hígado, riñón, glándula adrenal, ovario, TA, pulmón y cerebro de roedores. Mientras que el receptor AT_{1b} se expresa principalmente en pituitaria y glándulas adrenales (Lu y cols., 2007, Burson y cols., 1994; Olaf Jöhren y cols., 2003). Además, parece ser que el receptor AT_{1a} es el principal implicado en los efectos presores centrales de la Ang II (Davisson y cols., 2000).

El hipotálamo, corazón y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal de SHR presenta niveles del ARNm del receptor AT_{1a} y del receptor AT_{1b}, superiores a los de la cepa WKY (Olaf Jöhren y cols., 2003). La diferente expresión génica de los receptores de AT_{1a} y de AT_{1b} en el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal de SHR y de WKY implica

la participación de los receptores AT₁ en la exagerada respuesta endocrina al estrés de SHR a la Ang II (Olaf Jöhren y cols., 2003).

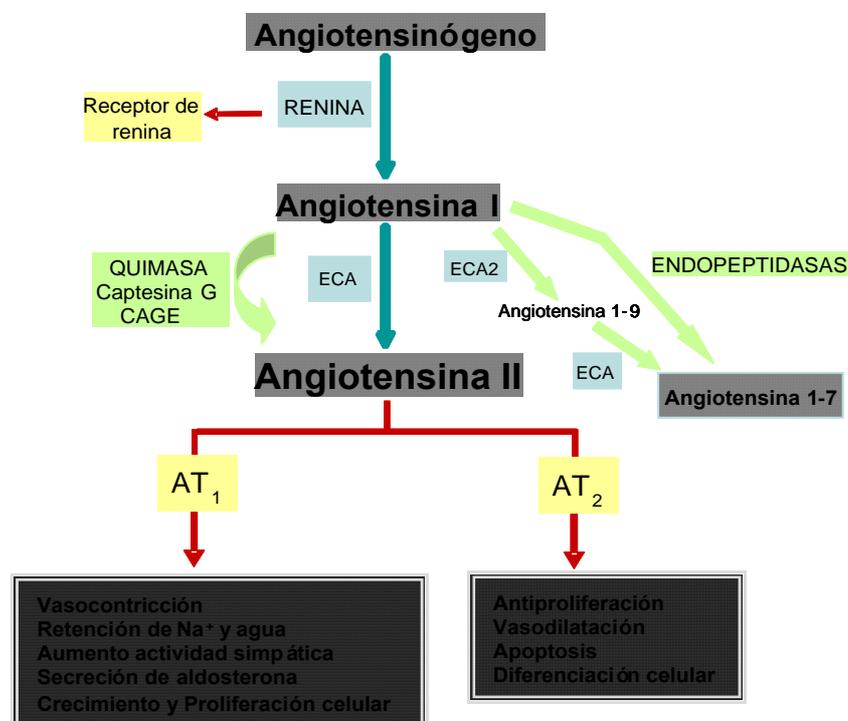


Figura 51: Esquema del SRA

1.1 Acciones de la angiotensina II

El SRA juega un papel primordial en la regulación de la presión arterial y es un mediador clave del daño a los órganos diana, eventos cardiovasculares y progresión de la enfermedad renal. Regula las resistencias vasculares periféricas directamente a través de los efectos de la Ang II y el volumen intravascular indirectamente a través de las acciones tanto de la Ang II como de la aldosterona.

La utilización de los nuevos antagonistas específicos de los receptores AT₁ ha permitido comprobar que la mayoría de las acciones características de la Ang II que ejerce sobre sus órganos diana, el riñón, el corazón, las arterias, los sistemas nervioso central y periférico y las glándulas adrenales, parecen estar mediadas a través de la estimulación de este tipo de receptores (Timmermas y cols., 1993), por los que la Ang II tiene una mayor afinidad.

A continuación se comentarán las acciones de la Ang II que afectan al sistema vascular.

1.1.1 Acciones sobre la contracción del músculo liso vascular

La Ang II participa en la regulación del tono vascular mediante su acción vasoconstrictora del músculo liso vascular y por su acción facilitadora de la transmisión adrenérgica. La Ang II aumenta el calcio libre citosólico, estimulando su entrada desde el espacio extracelular a través de canales tipo L o T, o su salida de los depósitos intracelulares. El calcio se une a la calmodulina activando la cinasa de la cadena ligera de la miosina, la cual a su vez cataliza la fosforilación de la miosina. Ello supone el establecimiento de la interacción actina-miosina y la contracción del músculo liso vascular (Dzau, 1986).

1.1.2 Acciones sobre el crecimiento vascular

Las acciones de la Ang II sobre el crecimiento vascular afectan a células tan diversas como las células musculares lisas, las células endoteliales o los fibroblastos. Ello posibilita la formación de nuevos capilares o angiogénesis, pero también el engrosamiento patológico de la pared vascular. Dicho engrosamiento se produce principalmente en el espacio subintimal y en la capa media, y se asocia a una acumulación anómala de colágeno en la adventicia. Las modificaciones estructurales de la pared arterial pueden ser debidas a tres procesos distintos: la hipertrofia, la hiperplasia y el remodelado de los componentes de la pared vascular (Mulvany y Aalkjaer, 1990; Heagerty, 1991). En general todos estos procesos suponen un incremento del cociente entre el grosor de la capa media y el diámetro de la luz del vaso debido a un aumento del grosor de la media, a una disminución del diámetro de la luz, a ambos a la vez, o simplemente a una reorganización de la pared del vaso que reduce la luz de éste, sin que exista proliferación celular o hipertrofia. Estas alteraciones de la estructura vascular tienen importantes repercusiones no sólo morfológicas, sino también funcionales para diversos órganos como el corazón, el SNC y el riñón.

La Ang II, junto con el estrés hemodinámico que tiene lugar en la hipertensión arterial, es uno de los principales factores causantes de las alteraciones morfológicas de la pared vascular (Heagerty, 1991). Las acciones de la Ang II sobre el crecimiento de la pared vascular dependen de la activación de los receptores AT₁ en las células musculares lisas y fibroblastos.

Es importante destacar que las señales intracelulares puestas en marcha por la Ang II, a corto plazo median la vasoconstricción, pero a largo plazo modifican la

expresión génica promoviendo la síntesis de ADN y de proteínas. La Ang II también es capaz de estimular la producción y la acción de factores mitogénicos como el factor básico de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento endotelial vascular o TNF- α que estimulan la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de proteínas.

La Ang II, a través de la estimulación de los receptores AT₁, también parece jugar un importante papel en la formación, migración y proliferación subendotelial de las células musculares lisas de la media que forman la neoíntima en respuesta al daño vascular producido por la angioplastia.

1.1.3 Acciones sobre el proceso aterogénico

Además, la Ang II puede ser considerada como un factor proaterogénico ya que influye en diversos mecanismos que participan en la iniciación y en el desarrollo de la aterosclerosis. Debido a su efecto vasoconstrictor la Ang II aumenta las resistencias periféricas y por tanto la presión arterial, favoreciendo el desarrollo de una lesión endotelial que es una pieza clave en el inicio del proceso ateroesclerótico. Asimismo, induce agregación plaquetaria, inhibe la activación del plasminógeno, es un factor quimiotáctico para linfocitos mononucleares y aumenta la permeabilidad de la pared arterial. También, como se comentó anteriormente la Ang II aumenta la producción de aniones superóxido (Ushio-Fukai y cols., 1996; Rajagopalan y cols., 1996) y con ello la peroxidación lipídica. La formación de células espumosas también se ve estimulada por la Ang II, ya que aumenta el número de receptores para LDL oxidadas en la membrana de los macrófagos y la captación de las lipoproteínas por éstos (Keidar, 1998). Además, la Ang II, directa o indirectamente a través de la estimulación de los factores de crecimiento de acción local, estimula la proliferación y la migración de las células musculares lisas y la producción de colágeno, elastina y proteoglicanos por la pared vascular, lo cual favorece la formación de la lesión ateroesclerótica.

Efectos de la Ang II mediados a través de sus receptores AT₁:

Vasos	Vasoconstricción arteriovenosa sistémica y coronaria Estimula la liberación de noradrenalina, aldosterona, vasopresina y endotelina-1 Inhibe la expresión de la NOS y la actividad vasodilatadora del NO
Corazón	Aumenta la contractilidad y frecuencia cardíacas
Sistema simpático	Aumenta el tono simpático central y periférico
Canales iónicos	Aumenta la entrada de Ca ²⁺ a través de canales L Activación/bloqueo de canales de K ⁺
Acciones tróficas	Aumenta la síntesis de proteínas (hipertrofia) y ADN (hiperplasia) Estimula la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares Aumenta la producción de matriz extracelular (fibrosis) Estimula la angiogénesis
Suprarrenales	Liberación de aldosterona y catecolaminas
Acciones centrales	Aumenta el tono simpático Liberación de vasopresina, ACTH, prolactina y LH Sed y apetito por la sal
Acciones renales	Vasoconstricción (eferente > aferente) Contracción y proliferación mesangial Aumenta la reabsorción de Na ⁺ y la excreción renal de K ⁺ Inhibe la secreción de renina
Acciones proinflamatorias	Activa monocitos/macrófagos Induce la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión Estimula la actividad NADP/NADPH y la oxidación de las LDL
Trombosis	Estimula la expresión de PAI-1 y 2 Activa las plaquetas, aumenta su adhesión y agregación

Efectos de la Ang II mediados a través de sus receptores AT₂:

Acciones antitróficas	Acciones antiproliferativas Inhibición de la angiogénesis y la proliferación celular Aumento de la apoptosis Activación de <i>colagenasas</i> cardíacas
Diferenciación	Diferenciación celular fetal y reparación tisular
Vasodilatación	Aumento de la síntesis de NO y cininas
Acciones renales	Reduce la reabsorción tubular proximal de Na ⁺ y bicarbonato Diuresis y natriuresis
Acciones centrales	Vasodilatación arteriolar cerebral Aumento de la conductancia al K ⁺ Liberación de prostaglandinas E ₂ /I ₂ y NO Secreción de LH y somatostatina Actividad motora e información sensitiva

Factores de crecimiento transformador-TGFβ1, plaquetario-PDGF, fibroblástico-FGF-2, tipo-insulina o IGF-1. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno

Tabla 7: Resumen de las acciones mediadas por la Ang II a través de sus receptores AT₁ y AT₂. Modificado de Tamargo y cols., 2006

II. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA “LOCAL” Ó “TISULAR”

Tradicionalmente se consideraba la existencia de un SRA circulante de acción fundamentalmente endocrina. Sin embargo, la demostración en las últimas décadas, de la existencia de todos los componentes del SRA y de sus ARNm en diferentes órganos y tejidos, como el hígado, el riñón, el corazón, el sistema nervioso central, los órganos reproductores, los vasos sanguíneos y el TA, indica la existencia de un SRA local o tisular que realiza funciones paracrinas, autocrinas y endocrinas (Paul y cols., 2006; Kim y cols., 2002).

2.1 Sistema renina angiotensina del tejido adiposo

2.1.1 Angiotensinógeno

Después del hígado, el TA (blanco y marrón) es la fuente más abundante de AGT en roedores (Cassis y cols., 1988; Gómez y cols., 1988; Frederich y cols., 1992; Phillips y cols., 1993) y humanos (Jones y cols., 1997; Engeli y cols., 1999).

La expresión de ARNm de AGT se ha detectado en TA periaórtico (TA marrón), en TA mesentérico (TA blanco) de ratas (Campbell y Habener., 1987, Cassis y cols., 1988a; 1988b) y en el TA subcutáneo y visceral de humanos (Karlsson y cols., 1998, Engeli y cols., 1999).

En ratas Sprague-Dawley la expresión del ARNm y la secreción de la proteína de AGT son significativamente más altas en el TA visceral (perirenal y epididimal) que en el TA subcutáneo (Serazin-Leroy y cols., 2000). En SHR (Tamura y cols., 1996) como en ratones obesos y diabéticos (Frederich y cols., 1992) la expresión génica de AGT en TA epididimal está también incrementada. Asimismo, en humanos los niveles del ARNm de AGT son significativamente mayores en el TA visceral que en el TA subcutáneo (Gilberta y cols., 2002).

2.1.2 Renina y receptor de renina

En la literatura existen datos contradictorios respecto a la expresión génica de renina en el TA de roedores y humanos. Mientras algunos investigadores han detectado niveles del ARNm de renina en TA epididimal de ratas (Zorad y cols., 2006; Pinterova y cols., 2000), en adipocitos subcutáneos humanos (Karlsson y cols., 1998; Gorzelnik

y cols., 2002; Engeli y cols., 2005) y preadipocitos (Schling y cols., 1999), otros investigadores no los han detectado (Harp y cols., 1995; Gilberta y cols., 2001; Saye y cols., 1993)

La presencia de este receptor de renina se ha publicado recientemente en el TA subcutáneo (Engeli 2005; Achard y cols 2007) y visceral humano (Zorad y cols, 2006; Achard y cols, 2007).

2.1.3 ACE, ACE2 y quimasa

La expresión génica de ECA se ha detectado tanto en TA subcutáneo como visceral humano (Gilberta y cols., 2002; Gorzelnia y cols., 2002; Engeli y cols., 1999, 2005; Jonson y cols., 1994; Karlsson y cols., 1998). Además, la actividad de la ECA se ha determinado en preadipocitos humanos (Schling y cols., 1999).

El ARNm, la proteína, y la actividad de la ECA se han detectado también en el TA epididimal and retroperitoneal (lumbar) de rata (Crandall y cols., 1992; Harp & DiGirolamo, 1995; Pinterova y cols., 2000).

Respecto, a la expresión génica, actividad o niveles de proteína de la ECA2 en el TA no existen datos en la literatura.

Por otro lado, la expresión de la α -quimasa solamente se ha descrito en adipocitos humanos (Engeli y cols., 1999).

2.1.4 Receptores de angiotensina

El subtipo del receptor de angiotensina que se expresa de forma más abundante en el TA blanco (Burson y cols., 1994; Crandall y cols 1994, 1999; Cassis y cols, 1996; Adams y cols., 2002) y en el TA marrón (Cassis y otros, 1996) es el subtipo del receptor AT₁. Además, Cassis y cols., en 1996 describieron que el TA blanco contenía un número más elevado de receptores AT₁ que TA marrón.

En el TA visceral humano el ARNm del receptor AT₁ es más abundante que en el subcutáneo (Gilberta y cols., 2002; Engeli y cols., 1999; 2003).

El TA de ratón expresa mayoritariamente el subtipo del receptor AT_{1a}. (Bursosn y cols., 1994).

Por otro lado, la expresión de los receptores AT₂ se ha determinado recientemente en el TA epididimal de WKY (Zorad y cols., 2006).

2.2 Implicación fisiológica o patofisiológica del SRA adiposo

En los seres humanos existe una correlación positiva entre la cantidad de TA y la actividad plasmática de renina, de ECA, y los niveles plasmáticos y adiposos de AGT (Engeli y cols., 2003, Goossens y cols., 2003). La expresión del AGT en el TA disminuye con el ayuno e incrementa con la realimentación. Además estos cambios en la expresión de AGT van acompañados por cambios paralelos en la presión arterial (Engeli y cols., 2003, Goossens y cols., 2003). En roedores la inhibición del SRA, con un inhibidor de la ECA o con un antagonista del receptor AT_1 , produce una disminución de la cantidad de TA y mejora la sensibilidad a la insulina (Engeli y cols., 2003, Goossens y cols., 2003).

Además de sus efectos bien conocidos sobre la presión arterial, el SRA está implicado en el desarrollo del TA. Durante la adipogénesis se induce el AGT y la Ang II (Engeli y cols., 2003). La Ang II promueve el crecimiento y la diferenciación del adipocito estimulando directamente la lipogénesis e indirectamente la síntesis de la prostaciclina (PGI_2) (Darimont y cols., 1994; Jones y cols., 1997; Engeli y cols., 2003). Sin embargo, en los adipocitos maduros la Ang II puede inhibir el reclutamiento de los preadipocitos (Engeli y cols., 2003). De esta manera, es probable que la síntesis local de Ang II contribuya a la modulación del flujo sanguíneo en el TA (perfusión del TA) y por lo tanto, a la regulación de su metabolismo.

La Ang II puede influir en la fisiología del TA al unirse a sus receptores localizados en los adipocitos, en las células del estroma vascular y en las terminaciones nerviosas, pudiendo influir directamente sobre el metabolismo del TA, o sobre la regulación de la perfusión y de la actividad local del sistema nervioso simpático (Crandall y cols., 1997). La Ang II inhibe la lipólisis, promueve la lipogénesis, disminuye el consumo de glucosa insulino-dependiente, e incrementa la gluconeogénesis hepática y la glucogenólisis (Engeli y cols., 2003). Además, el SRA adiposo regula la expresión de los factores endocrinos derivados del TA, como la prostaciclina, el NO, el PAI-1, y la leptina (Engeli y cols., 2003, Goossens y cols., 2003).

En modelos transgénicos de roedores, los niveles de AGT adiposo correlacionan con los niveles de presión arterial y la cantidad de TA. De esta manera, ratones con sobre-expresión del AGT adiposo presentan niveles elevados de la presión arterial e incremento de la cantidad de TA (Massiéra y cols., 2001). Además, en estos animales se

ha visto que el AGT adiposo se secreta a la circulación, por lo que el TA además del hígado es una fuente importante de AGT y Ang II circulante (Massiera y cols., 2001). Esto, sumado al hecho de que los individuos obesos presentan niveles circulantes de AGT anormalmente elevados (Umemura y cols., 1997), sugiere la posible implicación del AGT adiposo en la patogénesis de la hipertensión asociada a la obesidad (Frederich y cols., 1992).

Por lo tanto, el SRA adiposo puede jugar un importante papel autocrino, paracrino, y endocrino en la patogénesis de la obesidad, de la resistencia a insulina, y de la hipertensión.

OBJETIVOS CONCRETOS

Este capítulo pretende caracterizar el SRA del tejido adiposo periaórtico, mesentérico y lumbar de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad. Para ello se determinará:

1. Si existen diferencias regionales en la expresión de los distintos componentes del sistema renina-angiotensina del tejido adiposo dentro de una misma cepa.
2. Si existe un patrón de expresión diferente del sistema renina-angiotensina del tejido adiposo en hipertensión, comparando la expresión de los componentes del sistema en el TAP y TAM entre WKY y SHR.
3. Los niveles de angiotensina I y II en el tejido adiposo de WKY y SHR.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras empleadas

Para la determinación de la expresión génica del SRA se utilizaron el ARNm y el ADNc obtenidos de las muestras de TAP, TAM y TAL que se emplearon en el estudio de la expresión génica de leptina (ver Material y Métodos, capítulo II, punto 4.1).

2. Procedimiento para la RT-(Taqman) PCR

Las condiciones de la RT-PCR para el análisis de la expresión génica del SRA del TA fueron las mismas que se emplearon para la determinación de la expresión génica de leptina (ver capítulo III, punto 4.1).

Los Taqman primers y sondas que se emplearon para cada gen del SRA se detallan en la siguiente tabla:

	Primer directo	Primer reverso	Sonda Taqman
AGT	5'-CTACGTTCACTTCCAAGGGAAGA-3'	5'-CACAGACACTGAGGTGCTGTTG-3'	5'-CCAGAACTCATGGAGCCCAGTCAGCT-3'
Receptor Renina	5'-CATCCCTGGTGAGGAAGTCAAG-3'	5'-CGCAAGGTTGTAGGGACTTTG-3'	5'-CATCCTTGAGACGAAACA-3'
Renina	5'-GGTGCCCTCCACCAAGTGT-3'	5'-GCTAGAGGATCCGAGGAGTCA-3'	5'-TCCCTCTACACTGCCTGTGAGATTCACA-3'
ECA	5'-TTGTCTGTCACTGGAGCCTGA-3'	5'-CCACACCAAAAGCAATCTTC-3'	5'-TGACAAATATAATGGCCACGTCCCGGT-3'
ECA2	5'-GAGGAGAATGCCAAAAGATGA-3'	5'-GAAATTTTGGGCGATCTTGA-3'	5'-CTGCGGCCAAATGGTCTGCCTT-3'
Quimasa	5'-GGCAGAAGCTCGAGGTGAA-3'	5'-GCCTAGGGTTAGCTTGGCTTTC-3'	5'-CATTTCATCAAACTATG-3'
AT_{1a} exon 1+2+6bp+3	5'-CCACATTCCTGAGTTAACATATGA-3'	5'-GAGTTGGTCTCAGACACTATTCGAAA-3'	5'-ATCACCAGGTTAAAGGTC-3'
AT_{1a} exon 1+3	5'-CACATTCCTGTCAAGTGGATT-3'	5'-CATTTTGTITTTTCIGGGTTGAGTTG-3'	SYBGreen
AT_{1b}	5'-TGCCACCAGGTTGAAAGA-3'	5'-ACGTGAATGTCTCTGACACTATTT-3'	5'-AAATGCACCGTGTGACGTGCGCA-3'
AT₂	5'-CCTCCTGTATTGTTTCGTTGGA-3'	5'-TGGAGCCAAGTAATGGGAAGTC-3'	5'-CCGCTTCCAACAGAAGCTCCGTAGTG-3'

Tabla 8: Taqman primers y sondas que se emplearon para la cuantificación de la expresión génica de los distintos componentes del SRA del TAP, TAM y TAL mediante RT- (Taqman) PCR. La concentración final de los TaqMan primers y sonda fue de 300 nM y 100 nM, respectivamente, en un volumen final de 25 µl.

El 18S se empleó como control interno de las muestras de TAM y TAL y el HPRT como control interno de las muestras de TAP. Los TaqMan primers utilizados

para estos controles internos se detallaron en la tabla 6 (Material y Métodos, capítulo II, apartado 4.3).

Se realizó una curva patrón para cada uno de los genes amplificados: 18S, HPRT, ECA, ECA2, quimasa, AGT, renina, receptor de renina, receptor AT_{1a} (isoforma larga y corta), AT_{1b} y el receptor AT₂. Para ello una vez obtenido el estándar cero de la curva patrón (ver procedimiento en capítulo III, 4.4) se prepararon siete diluciones seriadas (1:10) de este estándar cero y se comprobó la curva en la RT-(Taqman) PCR.

Todas las muestras se midieron por triplicado y los datos de expresión de cada muestra se normalizaron por su control interno.

3. Isoformas del receptor AT_{1a}, en el TAP, TAM y TAL de WKY y SHR de 12 semanas de edad

Cowling y cols, describieron la presencia de tres isoformas del receptor AT_{1a} en fibroblastos cardíacos de rata, así como en otros órganos y tejidos, a excepción del TA. Además, demostraron que el tratamiento con citoquinas incrementaba los niveles proteicos del receptor AT_{1a}. En concreto, la isoforma que más incrementaba era la isoforma denominada AT_{1a} exon 1+3.

Para analizar si estas isoformas del receptor AT_{1a} se expresaban en el TA de WKY y SHR, una vez extraído el ARNm de los tres tejidos adiposos y realizada la transcripción inversa, se realizó una PCR con 1 µg del ADNc obtenido y los primers del receptor de la angiotensina II, el AT_{1a}. Los productos de la PCR se comprobaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Dada la relación entre citoquinas e hipertensión, se determinaron también los niveles del ARNm de la isoforma AT_{1a} exon 1+3 en las muestras control de TAP de ratas WKY y SHR. Para ello, se purificó la banda correspondiente a esta isoforma, se extrajo el ADNc (QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN® GmbH, Alemania)) y se secuenció (ExoSAP-IT®, USB Corporation, Ohio, USA). Se diseñaron los Taqman primers correspondientes para la amplificación de esta isoforma del receptor y se realizó una RT-PCR (SYBGreen) con las muestras de TAP de ratas WKY y SHR.

4. Determinación de los niveles de angiotensina I y angiotensina II en el TAP, TAM Y TAL de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad por HPLC

Para la determinación por HPLC de los niveles de Ang I y Ang II se homogenizó 10 mg de cada tejido adiposo en 100 μ L de una solución que contenía TRIS (50 mmol/L, pH= 7.4), 0.1mmol/L de EDTA, y 1 mg/mL bacitracina. Después se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 10 min. Se extrajo el sobrenadante y se inyectaron 50 μ l de cada muestra en un cromatógrafo Kromasil C8 y una columna (0.4 x20 cm) y el eluyente fue medido en un gradiente creciente de 26% a 70% de acetonitrilo/agua, que contenía ácido trifluoroacético al 0.05%. Se recogieron las fracciones que contenían Ang I y Ang II y se concentraron en un sistema de *speed-vacuum* y se resuspendieron en 50 mL de TRIS (50 mmol/L, pH=7.4). Finalmente, la Ang I y la Ang II se cuantificaron usando un Kit de ELISA específico para rata (Phoenix, USA).

5. Análisis estadístico

Los valores de los resultados obtenidos se expresaron mediante la media aritmética y el error estándar de la media aritmética (E.S). En todos los experimentos se indica el número de casos por grupo experimental.

En el análisis de las posibles diferencias entre distintos grupos experimentales se utilizó el programa estadístico StatView de Sas Institute Inc., versión 2002. Para comparar diferentes cepas y grupos de tratamiento las diferencias entre las medias se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido de un postest (Fisher's). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Isoformas del receptor AT_{1a} , en el TAP, TAM y TAL de WKY y SHR de 12 semanas de edad

Los resultados de la PCR del receptor de la Ang II, el AT_{1a} , indicaron la presencia de tres isoformas de este receptor en los tres TA de ambas cepas, WKY y SHR. Como indica la figura 52, en el gel de agarosa se obtuvieron tres bandas correspondientes al receptor AT_{1a} , la predominante o típica del receptor AT_{1a} , denominada AT_{1a} exon 1+2+6bp+3, otra con unas 300 pares de bases, denominada AT_{1a} exon 1+2+3, y una tercera con alrededor de 200 pares de bases, que no presenta el exon 2, y que se denomina AT_{1a} exon 1+3 (Figura 52).

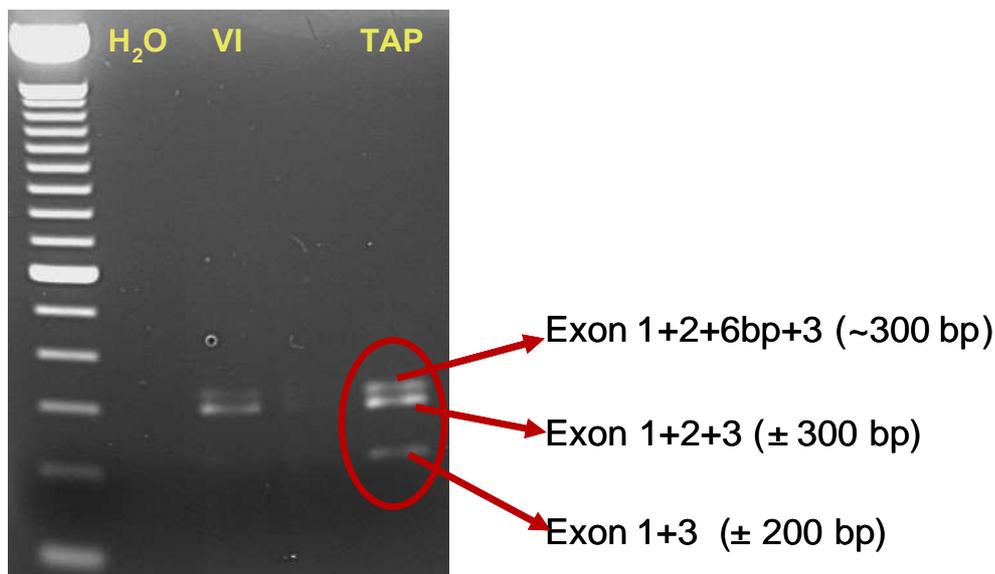


Figura 52: Comprobación de los productos de la PCR del receptor de Ang II AT_{1a} en gel de agarosa al 1%. Como muestras se emplearon agua (H_2O), para detectar posible contaminación), ventrículo izquierdo (VI, como control) y TA periaórtico de una muestra de WKY tratada con leptina.

2. Estudio de las diferencias regionales en la expresión génica de los distintos componentes del sistema renina-angiotensina dentro de una misma cepa

A continuación se muestran los niveles de expresión del ARNm de cada uno de los componentes del SRA analizados en el TAP, TAM y TAL de ratas control WKY y SHR de 12 semanas de edad.

2.1 Angiotensinógeno (AGT)

En la cepa WKY la expresión génica de AGT fue similar en las muestras de TAP, TAM y TAL (Figura 53A). Sin embargo, en la cepa SHR la expresión génica de AGT fue significativamente mayor en el TAM y TAL que en el TAP (Figura 53B). Además, no se encontraron diferencias significativas los niveles del ARNm de AGT entre el TAM y el TAL. Por lo tanto, la expresión génica de AGT en la cepa SHR es diferente entre el TA blanco (TAM y TAL) y el TA marrón (TAP).

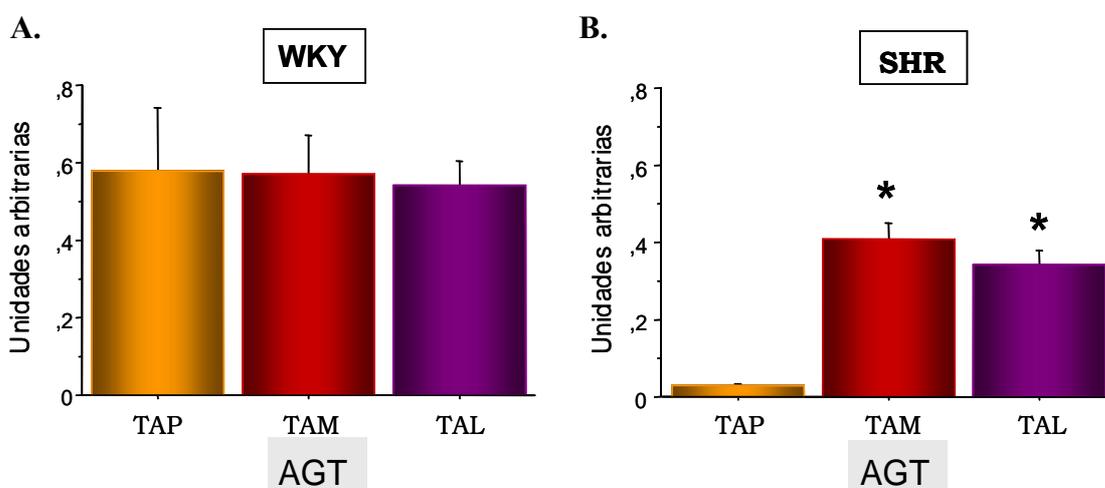


Figura 53: Expresión del ARNm de AGT en el TAP, TAM, TAL de WKY (A) y SHR (B) de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 6-12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs TAP $p < 0,05$

2.2 Renina y receptor de renina

En ambas cepas, los niveles del ARNm de renina fueron indetectables en los tres tipos de tejidos adiposos analizados, aunque si se detectaron niveles de ARNm de renina en los controles de corteza renal y riñón utilizados.

Por otro lado, tanto en el TAP como en el TAM y el TAL, se detectaron niveles del ARNm del receptor de renina, siendo, en ambas cepas, la expresión génica de este receptor significativamente mayor en el TAP que en el TAM y el TAL (Figura 54A y B). Además, en ambas cepas los niveles del ARNm del receptor de renina fueron similares entre el TAM y el TAL. Estos resultados sugieren al igual que sucedió con el AGT en la cepa SHR, que la expresión génica del receptor de renina es significativamente diferente entre el TA blanco y el marrón, en WKY como en SHR.

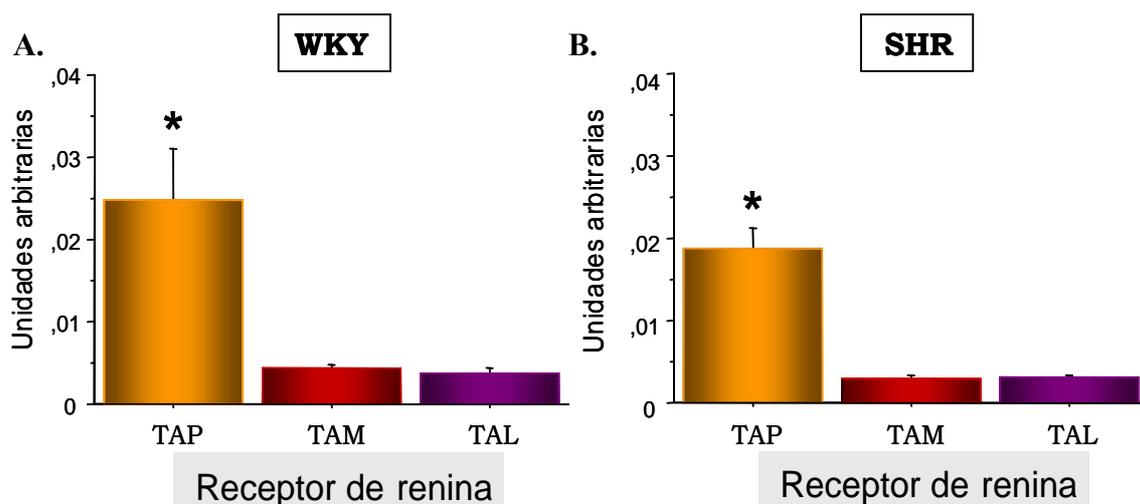


Figura 54: Expresión del ARNm del receptor de renina en el TAP, TAM, TAL de WKY (A) y SHR (B) de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 6-12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs TAM y TAL $p < 0,05$.

2.3 Enzima convertidora de angiotensina (ECA, ECA2) y quimasa

La expresión génica de ECA en la cepa WKY fue estadísticamente superior en el TAL que en el TAP y el TAM. Entre el TAP y el TAM no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles del ARNm de la ECA (Figura 55A).

Por el contrario, en la cepa SHR la expresión génica de ECA, fue significativamente superior en el TAM y el TAL que en el TAP. A su vez, los niveles del ARNm de la ECA fueron significativamente mayores en el TAL que en el TAM (Figura 55B).

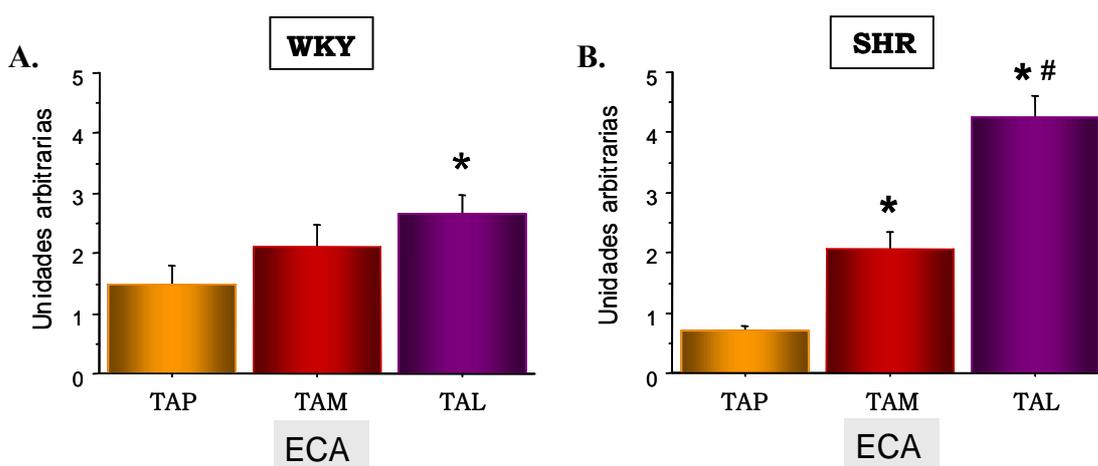


Figura 55: Expresión del ARNm de ECA en el TAP, TAM, TAL de WKY (A) y SHR (B) de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 6-12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs TAP y (#) estadísticamente significativo vs TAM. $p < 0,05$.

Respecto a la expresión génica de la ECA2 en la cepa WKY, su expresión fue similar en los tres tejidos adiposos (Figura 56A). Pero en la cepa SHR la expresión de ECA2 fue significativamente mayor en el TAM que en el TAP y el TAL. Entre el TAP y TAL no se encontraron diferencias significativas (Figura 56B).

Por otro lado, tanto en WKY (Figura 56C) como en SHR (Figura 56D), la expresión génica de la quimasa fue significativamente mayor en el TAM y el TAL que en el TAP. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles del ARNm de quimasa entre el TAM y el TAL. De nuevo, estos resultados sugieren que la expresión génica de la quimasa es diferente en WKY y SHR, en función del tipo de TA (blanco o marrón) analizado.

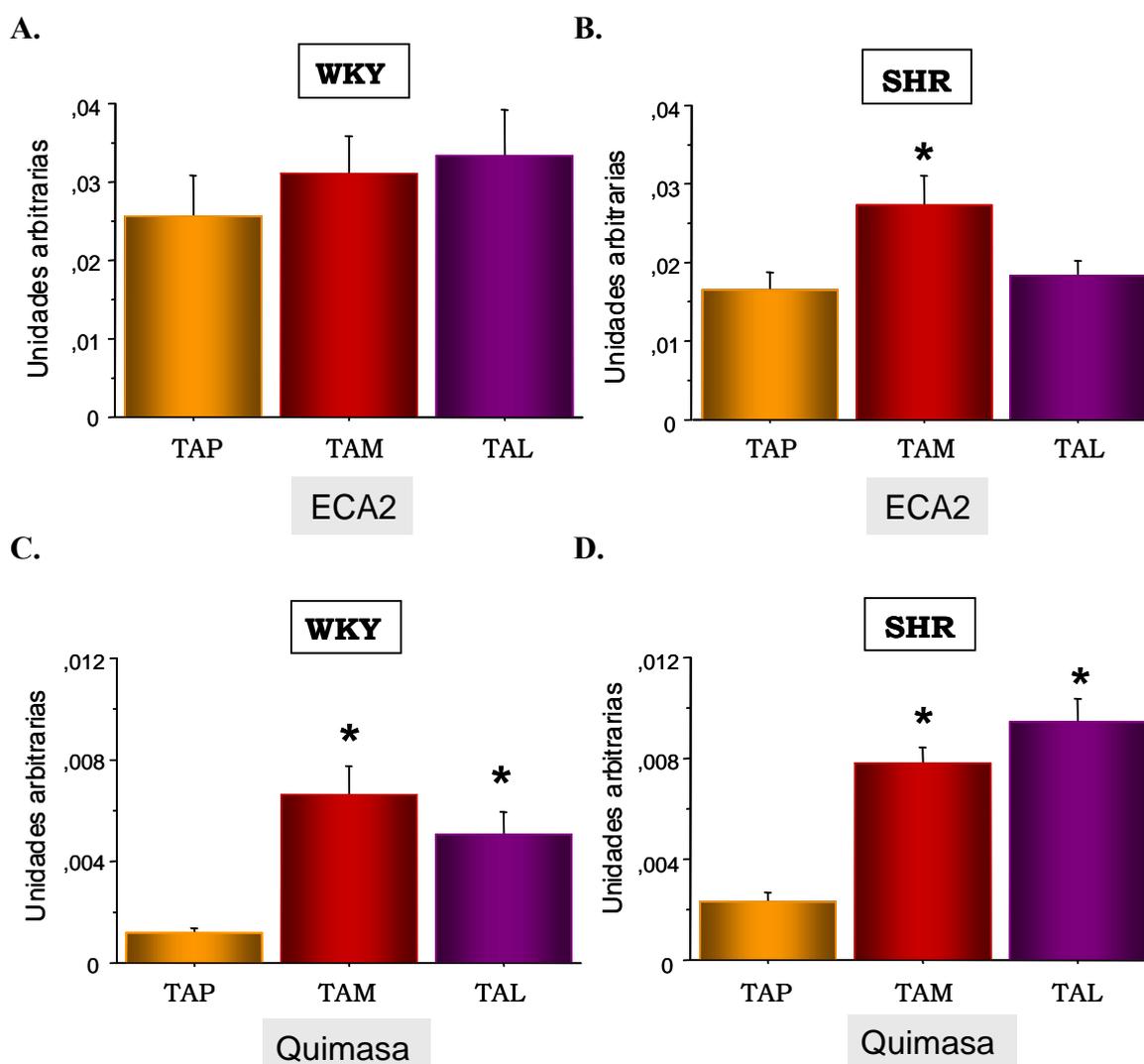


Figura 56: Expresión del ARNm de ECA2 y quimasa en el TAP, TAM, TAL de WKY (A, C) y SHR (B, D) de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs TAP y TAL $p < 0,05$.

2.4 Receptores de angiotensina II: AT_{1a}, AT₂

Al igual que la quimasa, en ambas cepas, los niveles del ARNm de la isoforma típica del receptor AT_{1a} (AT_{1a} exon 1+2+6bp+3), fueron significativamente mayores en el TAM y el TAL que en el TAP (Figura 57A y B). Entre el TAM y el TAL, los niveles del ARNm de esta isoforma receptor AT_{1a} fueron similares (Figura 57A y B). Esto indica que en WKY como en SHR, la expresión génica del receptor AT_{1a}, es significativamente mayor en el TA blanco que en el marrón.

Respecto a la expresión génica del receptor AT₂ se detectaron niveles del ARNm del receptor AT₂ en los tres tipos de tejidos adiposos de ambas cepas, siendo la expresión del receptor en la cepa WKY, significativamente mayor en el TAM que en el TAP y el TAL. En cambio, en la cepa SHR, los niveles del ARNm del receptor AT₂ fueron significativamente mayores en el TAP y el TAM que en el TAL (Figura 57C y D).

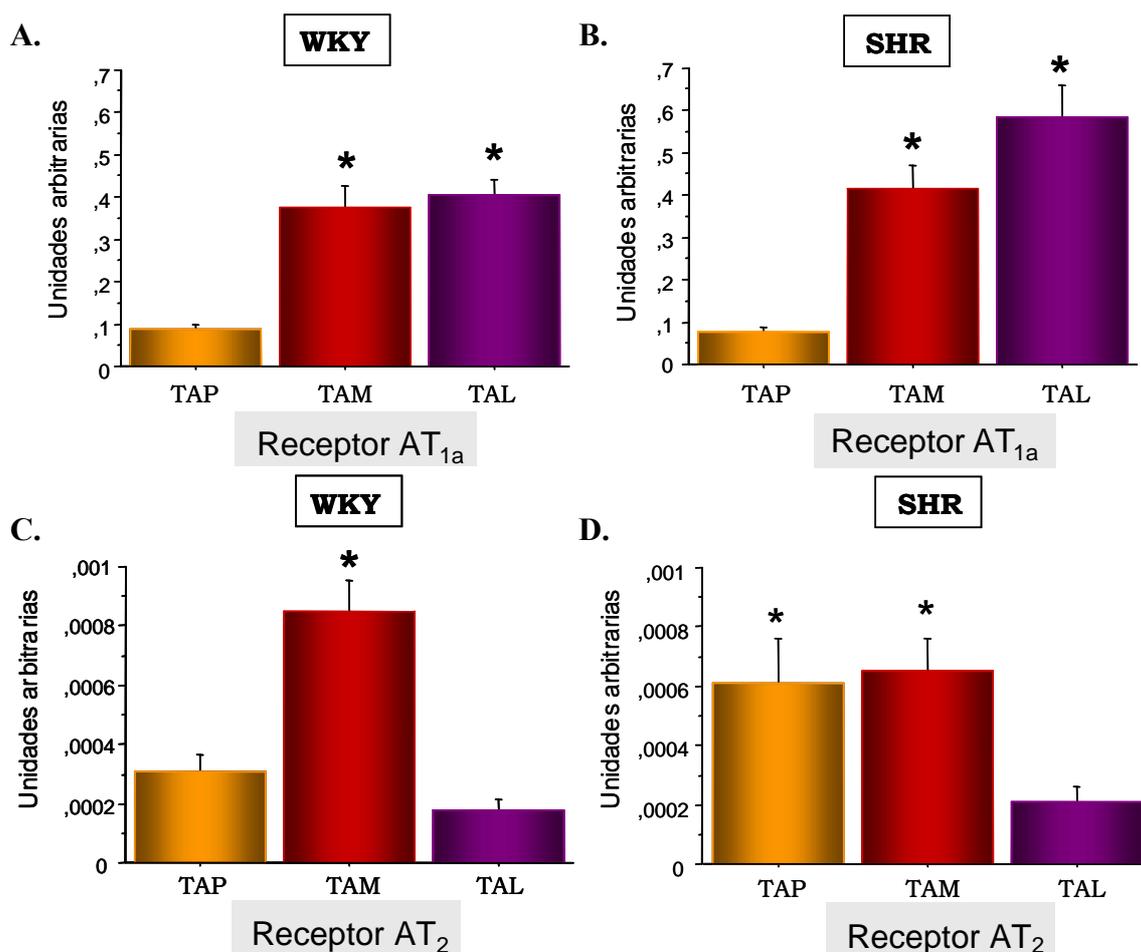


Figura 57: Expresión del ARNm del receptor AT_{1a} Exon 1+2+6bp+3 y AT₂ en el TAP, TAM, TAL de WKY (A, C) y SHR (B, D) de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media ± E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs TAP y TAL p<0,05.

3. Comparación del patrón de expresión génica del sistema renina-angiotensina del tejido adiposo entre WKY y SHR de 12 semanas de edad

3.1 Expresión génica del sistema renina-angiotensina en el tejido adiposo periaórtico

La expresión génica del AGT (figura 58A) y del receptor de renina (Figura 58B) en el TAP fue significativamente menor en la cepa SHR que en la WKY.

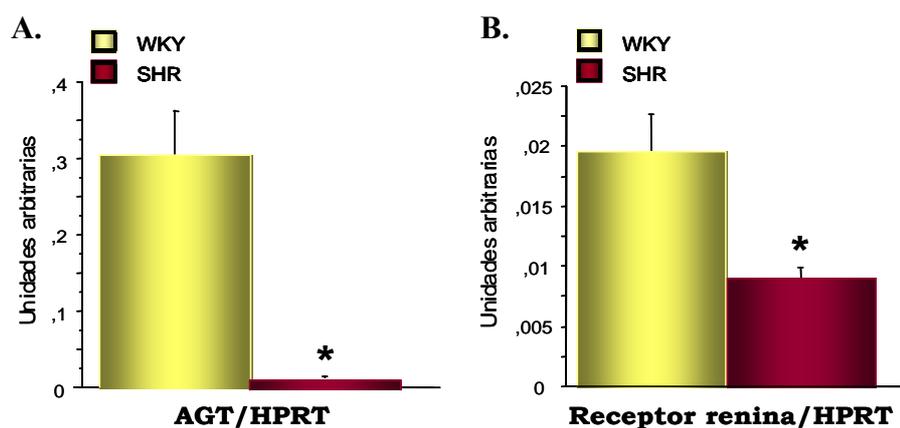


Figura 58: Expresión del ARNm de AGT (A) y del receptor de renina (B) en el TAP de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno HPRT. Los datos representan la media \pm E.S de 6 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$

Asimismo, los niveles del ARNm de ECA (Figura 59A) y ECA2 (Figura 59B) fueron también significativamente menores en SHR que en WKY. Sin embargo, la expresión génica de la quimasa en el TAP fue significativamente mayor en la cepa SHR que en la WKY (Figura 59C).

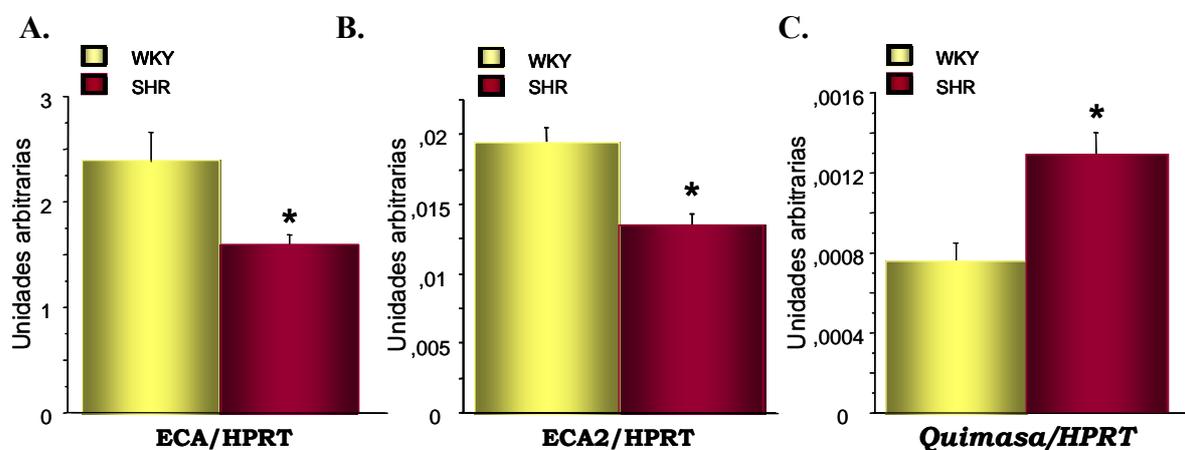


Figura 59: Expresión del ARNm de ECA (A), ECA2 (B) y chimasa (C) en el TAP de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno HPRT. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

Respecto a la expresión génica de los receptores de angiotensina II en el TAP se encontró que los niveles de ARNm de la isoforma típica del receptor AT_{1a} (AT_{1a} exon 1+2+6bp+3), fueron similares entre WKY y SHR (Figura 60A). Aunque la expresión de la isoforma AT_{1a} exon 1+3 fue significativamente inferior en la cepa SHR que en la cepa WKY (Figura 60B).

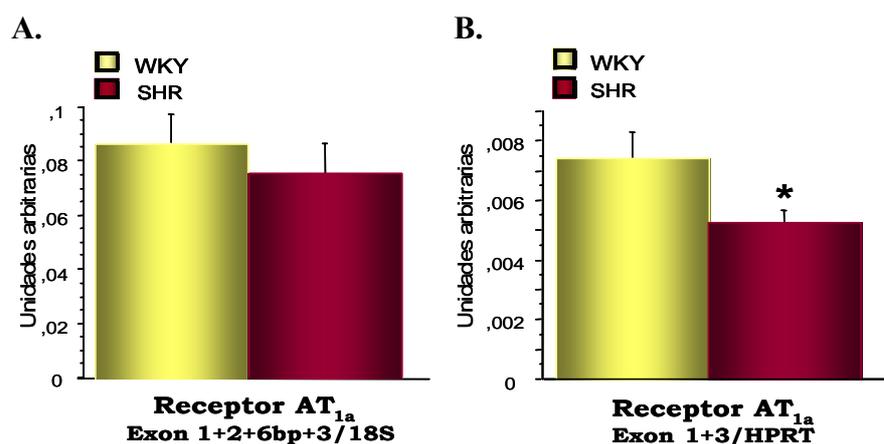


Figura 60: Expresión del ARNm del receptor AT_{1a} (AT_{1a} exon 1+2+6bp+3) (A) y de la isoforma del receptor AT_{1a} exon 1+3 (B) en el TAP de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S y HPRT. Los datos representan la media ± E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$

También se detectaron niveles del ARNm del receptor AT_{1b} en el TAP siendo estos significativamente menores en la cepa SHR que en la cepa WKY (Figura 61).

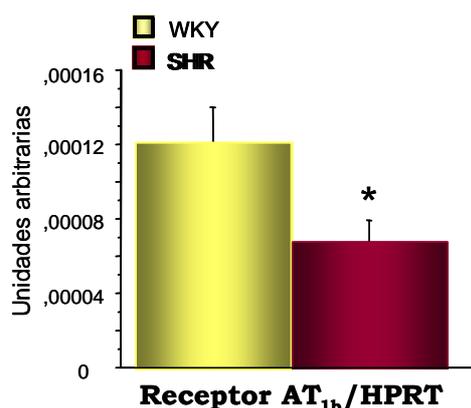


Figura 61: Expresión del ARNm del receptor AT_{1b} en el TAP de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno HPRT. Los datos representan la media ± E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$

Por último, la expresión génica del receptor de AT₂ en el TAP, fue similar en WKY y SHR (Figura 62).

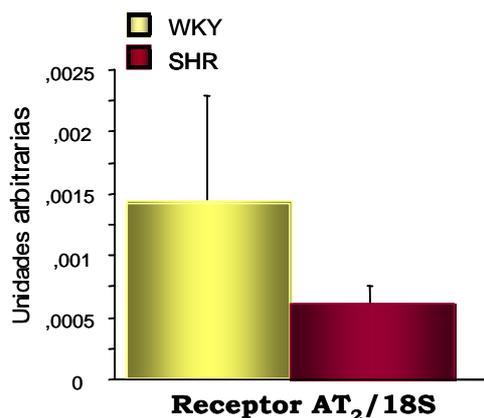


Figura 62: Expresión del ARNm del receptor AT₂ en el TAP de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media ± E.S de 12 determinaciones/cepa.

Por lo tanto, en el TAP el patrón de expresión génica del SRA es diferente entre WKY y SHR, siendo su expresión en la cepa hipertensa significativamente menor que en WKY, a excepción de la quimasa, que se expresa más en SHR que en WKY, y de los receptores AT_{1a} (AT_{1a} exon 1+2+6bp+3) y AT₂ que se expresan de forma similar en ambas cepas.

3.2 Expresión del sistema renina-angiotensina en el tejido adiposo mesentérico

Como indica la figura (63A) la expresión génica del angiotensinógeno en el TAM fue similar en WKY y SHR. Sin embargo, los niveles del ARNm del receptor de renina fueron significativamente menores en la cepa SHR comparado con WKY (Figura 63B).

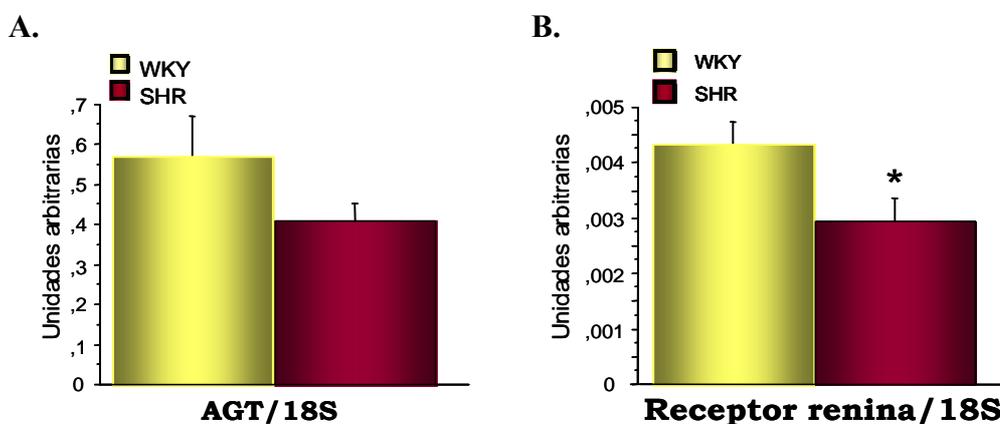


Figura 63: Expresión del ARNm de AGT (A) y del receptor de renina (B) en el TAM de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media ± E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

Respecto a la expresión génica de las enzimas convertidoras de angiotensina, tanto la ECA (Figura 64A) y como la ECA2 (Figura 64B) se expresaron de forma similar en el TAM de ambas cepas. Asimismo, los niveles del ARNm de la quimasa en el TAM fueron similares entre WKY y SHR (Figura 64C).

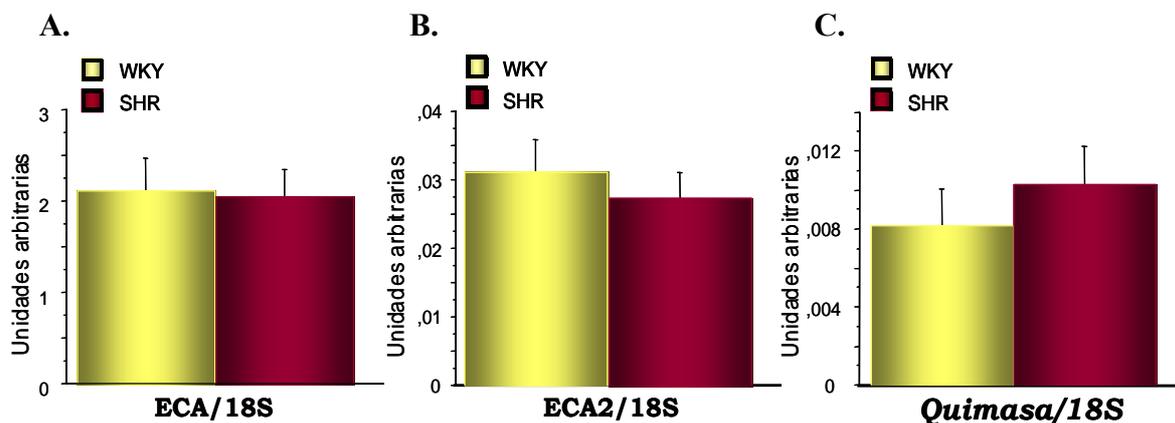


Figura 64: Expresión del ARNm de ECA (A), ECA2 (B) y quimasa (C) en el TAM de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa.

Además, se determinaron los niveles del ARNm de los receptores de AT_{1a} (exon 1+2+6bp+3) y AT₂ siendo su expresión génica similar entre en el TAM de WKY y el de SHR (figura 65A y B, respectivamente). Sin embargo, en este TA, no se determinaron ni la expresión de la isoforma del receptor AT_{1a} exon 1+3, ni la del receptor AT_{1b}.

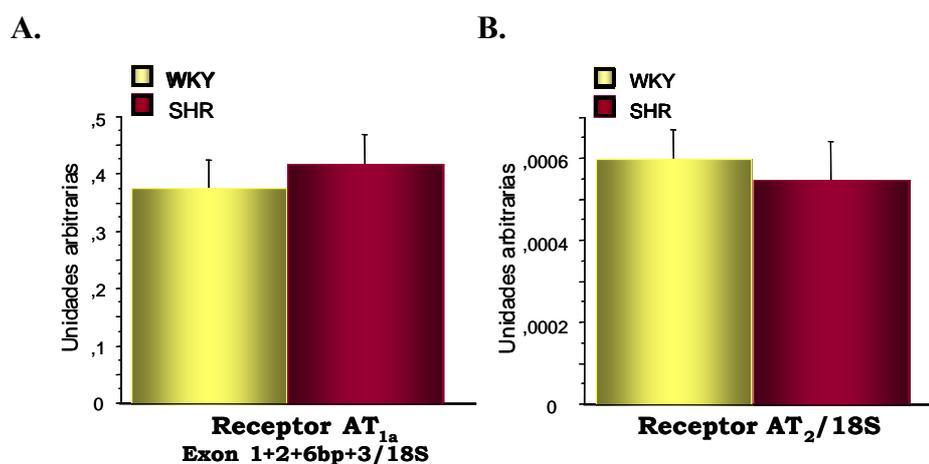


Figura 65: Expresión del ARNm del receptor AT_{1a} Exon 1+2+6bp+3 (A) y AT₂ (B) en el TAM de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están corregidos por el control interno 18S. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa.

Por lo tanto, el patrón de expresión del SRA en el TAM es similar en ambas cepas, a excepción de la quimasa, cuya expresión génica es significativamente menor en la cepa hipertensa.

4. Niveles de angiotensina I y angiotensina II en el TAP, TAM Y TAL de ratas WKY y SHR de 12 semanas de edad

En la cepa WKY los niveles de Ang I fueron significativamente mayores en el TAM, que en el TAP (Figura 66A). Respecto a los niveles de Ang II en WKY (Figura 66C), estos fueron significativamente mayores en el TAM que en el TAP y el TAL. En cambio, en la cepa SHR, los niveles de Ang I (Figura 66B) fueron similares en los tres TA analizados y los de Ang II fueron significativamente mayores en el TAP con respecto al TAL (Figura 66D).

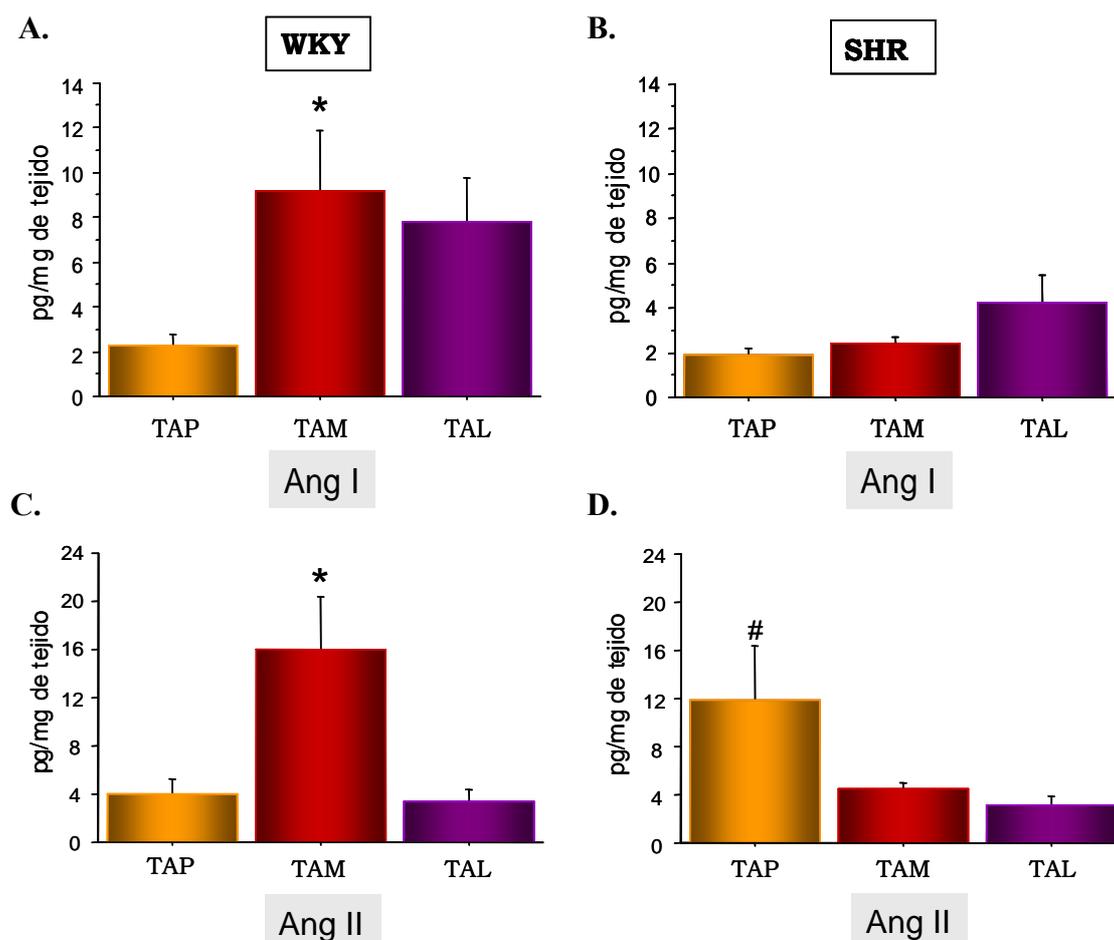


Figura 66: Niveles de Ang I en (A) WKY, (B) SHR) y Ang II en (C) WKY, (D) SHR) determinados por HPLC y ELISA en el TAP, TAM y TAL de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los resultados están expresados en pg/mg de TA. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa. (*, #) estadísticamente significativo $p < 0,05$.

Comparando los niveles de Ang I (figura 67A) y Ang II (figura 67B) entre cepas, se encontró que los niveles de ambos péptidos fueron significativamente mayores en el TAM de WKY que de SHR.

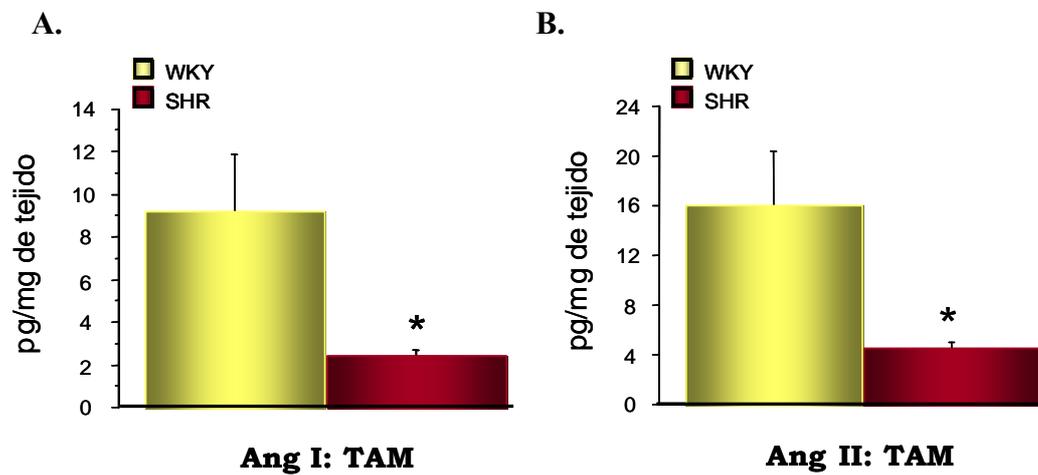


Figura 67: Niveles de Ang I (A) y de Ang II (B) en el TAM de WKY y SHR de 12 semanas de edad. Los datos representan la media \pm E.S de 12 determinaciones/cepa. (*) estadísticamente significativo vs control $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

El TA contiene los componentes necesarios del SRA para la síntesis local de Ang II (Engeli y cols., 1999; Harp y cols., 1995; Crandall y cols., 1994; Saye y cols., 1993). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre el SRA del TA se han realizado en TA subcutáneo y visceral (epididimal y lumbar), y se ha prestado poca atención al TA perivascular. Este TA rodea casi todos los vasos sanguíneos en mayor o menor cantidad y es de diferente tipo, dependiendo del lecho vascular. Así, el TAM es blanco (Hausmann y cols., 2001), mientras que el TAM es marrón (Kortelainen y cols., 1993; Mathias y cols., 1994).

La importancia de los resultados obtenidos en este capítulo radica en que es la primera vez que se caracteriza la expresión génica de todos los componentes del SRA, a excepción de la renina, así como los niveles de Ang I y Ang II en el TA perivascular, concretamente en el TA marrón que rodea la arteria torácica aórtica y el TA blanco que rodea el lecho vascular mesentérico. Además, se ha realizado un estudio comparativo entre ratas normotensas, WKY, e hipertensas, SHR. Por otra parte, en la literatura no existen resultados previos sobre la expresión génica de ACE2 en el TA, y tampoco se ha descrito previamente la existencia de tres isoformas del receptor AT_{1a} en el TA.

En primer lugar comparamos la expresión de los componentes del SRA en una misma cepa en diferentes TA.

Los resultados obtenidos indican que existe un patrón de expresión génica de AGT diferente entre los tres tipos de TA: TAP, TAM y TAL en WKY y SHR. De manera, que en WKY la expresión génica de AGT es similar en los tres TA analizados y en cambio, en SHR, su expresión es mayor en el TAM y TAL que en el TAP. Por lo tanto, en WKY los niveles del ARNm de AGT son similares entre el TA marrón y el blanco, pero en SHR son significativamente mayores en el TA blanco.

El AGT se sintetiza además de en el hígado, en el TA (blanco y marrón) de roedores (Cassis y cols., 1988; Gómez y cols., 1988; Frederick y cols., 1992; Phillips y cols., 1993) y humanos (Jones y cols., 1997; Engeli y cols., 1999). Se han detectado niveles del ARNm de AGT en el TA periaórtico (TA marrón), en el TA mesentérico (TA blanco) de ratas (Campbell y Habener., 1987; Cassis y cols., 1988a; 1988b) y en el TA subcutáneo y visceral de humanos (Karlsson y cols., 1998; Engeli y cols., 1999). Además, la expresión génica de AGT es significativamente mayor en el TA visceral

(perirenal y epididimal) que en el TA subcutáneo de roedores (Serazin-Leroy y cols., 2000) y humanos (Gilberta y cols., 2002). Así como en el TA epididimal de SHR que en WKY (Tamura y cols., 1996) y en los ratones obesos y diabéticos (Frederich, 1992).

Con respecto a la expresión del ARNm de renina en TA hay resultados contradictorios en la literatura unos detectan y otros no (Engeli y cols., 2003). En nuestro trabajo, en los tres tipos de TA analizados, TAP, TAM y TAL, la expresión del ARNm de renina era imperceptible. Estos resultados apoyan el concepto de que el papel funcional del SRA del TA perivascular no depende de síntesis local de renina, sino que parte de la renina o prorenina es recaptada de la circulación. A este respecto, es interesante la detección por primera vez, del recién identificado receptor de renina (Nguyen G y cols., 2002) tanto en el TA marrón (TAP) como en el TA blanco (TAM y TAL) de WKY y SHR. Recientemente, se ha descrito la presencia de este receptor en el TA subcutáneo (Engeli y cols., 2005; Achard y cols., 2007) y visceral humano (Achard y cols., 2007; Zorad y cols., 2006). La expresión del receptor de renina es significativamente mayor en el TA marrón (TAP) que en el TA blanco (TAM y TAL) en ambas cepas.

La expresión concomitante del AGT y del receptor de renina en TA perivascular pone de manifiesto la posibilidad de la síntesis local de Ang I en el TA perivascular. De hecho, se han detectado niveles elevados de Ang I en los tres tipos de tejidos adiposos: TAP, TAM y TAL, en WKY y en SHR. Los niveles peptídicos de Ang I en el TAM de WKY fueron significativamente superiores a los encontrados en el TAP, sin embargo, en la cepa hipertensa no se encontraron diferencias entre ambos TA.

Respecto a la Ang II, también se han detectado niveles elevados en el TA marrón y en el TA blanco de WKY y SHR. Al igual que ocurrió con la Ang I, los niveles de Ang II fueron significativamente superiores en el TAM que en el TAP de WKY y no se encontraron diferencias entre los niveles peptídicos de Ang II entre el TAM y el TAP de SHR. Por el contrario, algunos autores han encontrado niveles cuatro veces superiores de Ang II en el TA marrón (Campbell y cols., 1993; 1995; Shenoy y cols., 1997) que en el TA blanco de rata (Engeli y cols., 1999).

La síntesis de Ang II en el TAP, TAM y TAL, puede ser catalizada tanto por la ECA como por la quimasa encontradas en estos TA. En la cepa WKY la expresión génica de la ECA fue similar entre el TAP y el TAM, mientras que fue

significativamente mayor en el TAL con respecto al TAP. En la cepa SHR, en cambio, la expresión génica de la ECA fue significativamente mayor en el TAM comparado con el TAP, y la expresión en el TAL fue significativamente mayor con respecto a los otros dos TA.

La expresión génica de la ECA se ha descrito en el TA blanco (Engeli y cols., 1999; Giacchetti y cols., 2002; Schling y cols., 1999; Jonsson y cols., 1994), mientras que no existen datos en la literatura con respecto a la expresión de la ACE en TA marrón. Se han detectado niveles del ARNm de la ECA además en el TA subcutáneo y visceral de roedores (Pinterova y cols., 2000; Crandall y cols., 1992) y humanos (Engeli y cols., 1999; Giacchetti y cols., 2002; Jonsson y cols., 1994). También se ha descrito actividad de la ACE en preadipocitos humanos (Schling y cols., 1999).

Respecto a la expresión de la α -quimasa ha sido sólo descrita anteriormente en adipocitos humanos (Engeli y cols., 1999). El hecho de que los niveles de la expresión del ARNm de la α -quimasa fueran más altos en el TAM que en TAP de ambas cepas, podría explicar que los niveles de Ang II en WKY sean más altos en el TAM. Sin embargo, en la cepa SHR a pesar de tener una mayor expresión de ECA y quimasa en el TAM que en TAP, no existen niveles de Ang II más elevados en el TAM, esto puede ser debido a que presenta también una mayor expresión de ECA2 en el TAM por lo tanto, podría suceder que la Ang I, que es similar entre el TAM y TAP, por acción de la ECA2 se transformara en Ang 1-9 y no en Ang II.

Los resultados obtenidos en WKY son interesantes porque el tratamiento con inhibidores de la ECA tendría distintos efectos dependiendo del lecho vascular, aorta o mesenterio. Así, la supresión de la síntesis local de Ang II en respuesta a la inhibición de la ECA se puede podría limitar en el TAP pero no en el TAM debido alta expresión génica de la α -chimasa que presenta.

Como comentamos anteriormente, la expresión del homólogo de la enzima convertidora de angiotensina, la ECA 2, que transforma la Ang I en angiotensina 1-9, la cual a su vez por acción de la ECA es transformada en angiotensina 1-7 (Tipnis y cols., 2000), no se ha descrito con anterioridad en TA. En WKY se encontró que la expresión de ECA2 era similar entre el TA blanco y el TA marrón. En cambio, en SHR los niveles del ARNm de ECA2 fueron significativamente superiores en el TAM comparado con el TAP y el TAL.

Respecto a los receptores de Ang II, el subtipo más abundante en el TA blanco (Burson y cols., 1994; Crandall y cols., 1999; Cassis y cols., 1996; Adams y cols., 2002) y el marrón (Cassis y cols., 1996) es el receptor AT₁. Cassis y cols., en 1996, describieron que el TA blanco contenía mayor número de receptores AT₁ que el TA marrón. De acuerdo con estos resultados, el TAM de las ratas WKY y SHR posee niveles del ARNm del receptor AT₁ significativamente superiores a los encontrados en el TAP.

Además, en roedores se han identificado y clonado dos subtipos del receptor AT₁ (AT_{1a} y AT_{1b}) que codifican por dos genes distintos (Iwai, y cols 1992; Sasamura, y cols., 1992). Pues bien, en el TA perivascular (TAM y TAP) de WKY y SHR, también se han detectado niveles, aunque muy bajos, del ARNm del receptor AT_{1b}.

Lo más destacado respecto a la expresión génica de los receptores AT_{1a}, es la presencia de tres isoformas de este receptor en el TA perivascular (TAM y TAP). Estas isoformas del receptor AT_{1a}, han sido recientemente descritas en fibroblastos cardíacos y en otros órganos y tejidos, a excepción del TA (Cowling y cols., 2005).

La isoforma típica del receptor AT_{1a}, denominada AT_{1a} exon 1+2+6bp+3, que contiene alrededor de unos 300 pares de bases, se expresa de forma significativa, más en el TAM que en el TAP de ambas cepas, mientras que la isoforma corta, AT_{1a} exon 1+3, que no presenta el exon 2 y que posee alrededor de 200 pares de bases, se expresa de forma similar en ambos tejidos (en el TAM sólo se determinó la expresión de este receptor en la cepa WKY). La función específica de cada una estas isoformas no se desconoce.

Por otro lado, la expresión del receptor AT₂ se ha descrito recientemente en el TA epididimal de las ratas WKY (Zorad y cols., 2006). Los resultados obtenidos muestran que este receptor también se expresa en el TA perivascular de WKY, como en el de SHR. En WKY los niveles del ARNm del receptor AT₂ fueron significativamente superiores en el TAM que en el TAP, mientras que en SHR fueron similares entre ambos tejidos.

Comparando la expresión génica del SRA del TAP entre ambas cepas encontramos que la expresión génica de AGT, el receptor de renina, de ECA, ECA 2, y del receptor AT_{1a} exon 1+3 fue significativamente menor en SHR que en WKY. Sin embargo, la expresión génica de la quimasa fue significativamente mayor en la cepa

hipertensa. Además, no se encontraron diferencias entre ambas cepas ni en la expresión génica del AT_{1a} exon 1+2+6bp+3, ni en los niveles del ARNm de los receptores AT₂, así como en los niveles de Ang I y Ang II.

En cambio, en el TAM la expresión génica de AGT, ECA, ECA 2, quimasa, los receptores AT_{1a} exon 1+2+6bp+3 y de los receptores AT₂ fue similar entre WKY y SHR. Sin embargo, los niveles del ARNm del receptor de renina y de los receptores AT_{1a} exon 1+3 fueron significativamente menores en la cepa hipertensa que en la normotensa. Curiosamente, a pesar de que la expresión génica del TAM es muy similar entre WKY y SHR, los niveles de Ang I y Ang II fueron significativamente menores en la cepa hipertensa.

Estos resultados indican que la expresión génica de los componentes del SRA del TAP está regulada a la baja en SHR. En cambio, la expresión del SRA del TAM fue similar entre ambas cepas.

En resumen, los resultados mostrados en este capítulo demuestran la existencia de un SRA completo en el TA perivascular (blanco y marrón) de WKY y SHR. Además, sugieren una síntesis local de Ang I y Ang II en ambos tejidos adiposos e indican, que el patrón de expresión génica de SRA perivascular es diferente en un TA y otro (blanco o marrón) por lo que el SRA podría desempeñar diferentes funciones en función del tipo de TA que rodee el vaso. Por otro lado, también sugieren que la expresión génica del SRA perivascular es diferente entre WKY y SHR en ambos tipos de TA, especialmente en el TAP.

Debido a que el TA perivascular ejerce un papel paracrino en la regulación de la función vascular (Soltis y Cassis, 1991) a través de la síntesis y secreción de varios factores vasoactivos, tales como el ADRF (Löhn y cols., 2002 ; Dubrovskaya y cols., 2004; Verlohren y cols., 2004; Gálvez y cols., 2006), la leptina (Gálvez y cols., 2006) y los aniones superóxido (Gao y cols., 2006) y a los efectos contráctiles, tróficos y proinflamatorios de la Ang II, la producción local de este péptido en el TA perivascular podría tener un impacto substancial en la función y la estructura vasculares. Por lo tanto, podría desempeñar un papel importante en el desarrollo de la hipertensión y en el remodelado vascular asociados a la obesidad (Paul 2006).

La Ang II sintetizada por el adipocito podría producir directamente una respuesta vasoconstrictora y modular así la respuesta a otras adipocitocinas como la leptina, el ADRF (Fortuño y cols., 2002). También, podría estimular la liberación de

NA (Zimmerman, 1972) desde las terminaciones nerviosas que inervan el TA perivascular, la cual produciría también un efecto vasoconstrictor.

Además, debido a las acciones pro-inflamatorias de la Ang II, las cuales representan un factor adicional importante en la regulación del tono y del remodelado vascular (Paul y cols., 2006), las acciones del SRA perivascular podrían desempeñar un papel importante en estos procesos. Por otro lado, otro posible papel del SRA perivascular podría ser en la regulación autocrina de la cantidad de TA. De hecho, la Ang II se considera un factor adipogénico implicado localmente en el crecimiento y desarrollo del TA (Darimont y cols., 1994; Crandall y cols., 1999; Jones y cols., 1997), la lipogenesis (Jones y cols., 1997), así como en la secreción de otras adipocitokinas (Kim y cols., 2002). Esto explicaría que la cepa SHR al tener menos cantidad de Ang II, que la cepa WKY, presente también menor cantidad de TAM que WKY.

Por otra parte, la existencia de un SRA perivascular adyacente a la adventicia de los vasos sanguíneos, podría proveer de una interfaz al SRA vascular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las ratas SHR de 4 y 12 semanas de edad presentan una menor cantidad de TAM y TAL que la cepa WKY.
2. Las ratas SHR de 12 semanas de edad poseen adipocitos mesentéricos más pequeños, sin cambios en el número de células y un menor contenido de lípidos totales.
3. El efecto anticontráctil del ADRF es significativamente menor en la cepa hipertensa y es dependiente de la cantidad de TA perivascular.
4. La cepa SHR de 4 semanas de edad, que es prehipertensa, ya presenta una menor cantidad y efecto anticontráctil del TA perivascular.
5. En la cepa WKY el efecto anticontráctil del ADRF disminuye con la edad.
6. La cepa SHR presenta niveles plasmáticos y mesentéricos de leptina significativamente menores a la cepa WKY. Existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de leptina y la cantidad de TAM.
7. El efecto vasodilatador de la leptina exógena es significativamente inferior en la aorta y en la arteria mesentérica superior de SHR que de WKY.
8. Estas diferencias en el efecto vasodilatador de la leptina exógena entre WKY y SHR no son debidas a diferencias en la expresión de la forma larga del receptor de leptina (Ob-Rb) ni a una menor capacidad de activar la vía de señalización a través de la P-STAT3/STAT3.
9. La expresión de la forma corta del receptor de leptina (Ob-Ra) es significativamente inferior en la aorta de SHR que de WKY.

10. El TAP, el TAM y el TAL de WKY y SHR expresan todos los componentes del SRA, excepto la renina.
11. Los niveles de Ang I y de Ang II son significativamente menores en el TAM de la cepa hipertensa.
12. Es la primera vez que se describe la expresión génica del receptor de renina, de la ECA2 y de tres isoformas del receptor AT_{1a} en el TA perivascular.
13. Existe un patrón de expresión génica de los distintos componentes de SRA diferente entre el TA blanco y el TA marrón.
14. La expresión génica del SRA del TAP es menor en SHR que en WKY. En cambio, en el TAM, la expresión génica del SRA fue muy similar entre ambas cepas.
15. Estos resultados sugieren que las alteraciones en la cantidad y función del tejido adiposo perivascular podrían contribuir al desarrollo y mantenimiento de la presión arterial elevada en la cepa SHR.

CONCLUSIONS

1. 4 and 12 week-old SHR have a smaller amount of mesenteric adipose tissue (MAT) and lumbar adipose tissue (LAT) than WKY.
2. 12 week-old SHR have smaller mesenteric adipocytes with a lower of total lipids content, without changes in the number of cells.
3. The anticontractile effect of the ADRF is significantly smaller in SHR and is depending of the amount of perivascular adipose tissue.
4. Prehypertensive SHR already have a smaller amount and anticontractile effect of the perivascular adipose tissue.
5. In WKY rats the anticontractile effect of the ADFR diminishes with the age.
6. SHR has lower leptin levels in plasma and mesenteric bed.
7. There is a correlation between plasma leptin levels and the amount of mesenteric adipose tissue.
8. Vasodilatory effect of exogenous leptin is reduced in aortic and mesenteric rings from SHR. This effect is not due to a different leptin receptor (Ob-Rb) expression or to differences in signaling transduction (P-STAT3/STAT3).
9. The expression of the leptin receptor Ob-Ra was lower in aorta of SHR.
10. Perivascular adipose tissue of aorta and mesenteric arteries from Wistar Kyoto and SHR rats has all components of the renin-angiotensin system (RAS), except renin.
11. Ang I and Ang II levels in TAM were significantly lower in MAT of SHR.

12. An important new finding is the expression of the (pro) renin receptor, ACE2 and of three AT_{1a} receptor isoforms in perivascular adipose tissue.
13. Gene expression levels of some RAS components are different between periaortic and perimesenteric fat and also between the strain.
14. In SHR the gene expression levels of RAS components of TAP was lower than WKY. However, the gene expression of RAS in TAM was similar in both strains.
15. These results suggest that alterations in the amount and function of perivascular fat could contribute to the development and maintenance of the elevated arterial pressure in SHR.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- **AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U.** The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2001; 276:39721-39726.
- **Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M.** Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292: R274-R282.
- **Adams F, Wiedmer P, Gorzelnia K, Engeli S, Klaus S, Boschmann M.** Age-related changes of Renin-Angiotensin system genes in white adipose tissue of rats. *Horm Metab Res.* 2002; 34:716-720.
- **Adeagbo ASO & Triggle CR.** Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 21: 423-429.
- **Ahima RS, Flier JS.** Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000; 62:413-437.
- **Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *J. Biochem.* 2001; 357:593-615.
- **Änggård EE.** The regulatory functions of the endothelium. *Jpn J Pharmacol,* 1992; 58:200-206.
- **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y.** Paradoxical decrease of an adipocitespecific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res. Commun.* 1999; 257:79-83.
- **Aronne, LJ.** Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks. *Obes Res.* 2002; 10:105-15.
- **Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre- Millo M, Le Marchand- Brustel Y, Lewin MJM.** The stomach is source of leptin. *Nature.* 1998; 394, 790-793.
- **Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG, Becker W.** Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol.* 2002; 16:859-72.

- **Banks, WA.** The many lives of leptin. *Peptides*. 2004; 25: 331–338.
- **Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr.** Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:14563-14572.
- **Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM.** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996; 17:305-311.
- **Baratta M.** Leptin – from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med. Sci. Monit.* 2002; 8: RA282–RA292.
- **Barham D, Trinder P.** An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*. 1972; 97:142–145.
- **Barr VA, Lane K and Taylor SI.** Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 21416–21424.
- **Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SL, Cushman SW.** Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology*. 1997; 138: 4463-4472.
- **Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW.** Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 1999 27; 848:114-23. Review.
- **Bauersachs J, Fleming I, Scholz D, Popp R, Busse R.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor, but not nitric oxide, is reversibly inhibited by brefeldin A. *Hypertension*. 1997; 30:1598-605.
- **Bauersachs J, Hecker M, Busse R.** Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br J Pharmacol.* 1994; 113:1548-1553.
- **Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R.** Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*. 1996; 94:3341-3347.
- **Belouzard S, Delcroix D and Rouillé Y.** Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:28499–28508.

- **Björbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS.** Identification of SOCS3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell.* 1998; 1, 619-625.
- **Björbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS.** Expression of leptin receptor isoform in rat brain microvessels. *Endocrinol.* 1998; 139: 3485-3491.
- **Björbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS.** Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 32686-32695.
- **Björbaek C and Kahn BB.** Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Rec. Prog. Horm. Res.* 2004; 59:305–331.
- **Bjorntorp P.** «Portal» adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 493-496.
- **Boegehold MA.** Microvascular changes associated with high salt intake and hypertension in Dahl rats. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1993; 12:143-156.
- **Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ.** Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994; 368:850-853.
- **Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Páth G, Hauner H, Tsokos M, Chrousos GP, Scherbaum WA.** Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes.* 2000; 49:532-538.
- **Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart- Bornstein M and Scherbaum WA.** Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland. Leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 1997; 46:1235-1238.
- **Bouchard C, Després JP, Mauriège P.** Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocrinol Rev* 1993; 14: 72-93.
- **Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA.** Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287:R943-9.

- **Bravo PE, Morse S, Borne DM, Aguilar EA, Reisin E.** Leptin and hypertension in obesity. *Vasc Health Risk Manag.* 2006; 2:163-9.
- **Briones AM, Gonzalez JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, Gonzalez MC, McGrath JC, Arribas SM.** Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol.* 2003; 552:185-195.
- **Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Tovar S, Vila E, Salaices M.** Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. *Life Sci* 2002; 71:1997–2014.
- **Bund SJ, Lee RM.** Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res.* 2003; 40:547-557.
- **Burson JM, Aguilera G, Gross KW, and Sigmund CD.** Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1994; 267: E260–E267.
- **Bush E, Maeda N, Kuziel WA, Dawson TC, Wilcox JN, DeLeon H, Taylor WR.** CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 2000; 36: 360-363.
- **Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, Quartieri F, Moschini L, Cavazzini S, Cavatorta A, Borghetti A.** Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension* 2002; 36:656-661.
- **Campbell DJ, Habener JF.** Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization in situ. *Endocrinology.* 1987; 121:1616-1626.
- **Campbell WB, Harder DR.** Prologue: EDHF--what is it? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280:H2413-H2416.
- **Campbell WB, Gauthier KM.** What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; 11:177-183.
- **Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR.** Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996; 78:415-423.

- **Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM.** Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension*. 1993; 22:513-522.
- **Campbell DJ, Rong P, Kladis A, Rees B, Ganten D, Skinner SL.** Angiotensin and bradykinin peptides in the TGR (mRen-2)²⁷ rat. *Hypertension*. 1995; 25:1014-1020.
- **Campfield LA, Smith JF y Burn P.** Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science*. 1998; 280:1383-1387.
- **Campfield AL, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995; 269:546-549.
- **Carlson EC, Burrows ME, Johnson PC.** Electron microscopic studies of cat mesenteric arterioles: a structure-function analysis. *Microvascular Res*, 1982; 24:123-141.
- **Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV.** Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*. 1996; 45:1455-1462.
- **Casassus P, Fontbonne A, Thibault N, Ducimetiere P, Richard JL, Claude JR, Warnet JM, Rosselin G, Eschwege E.** Upper body fat distribution: a hyperinsulinemia-independent predictor of coronary heart disease mortality - The Paris prospective study. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 1387-1392.
- **Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ.** Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ Res*. 1988a; 62:1259-62.
- **Cassis LA, Saye J, Peach MJ.** Location and regulation of rat angiotensinogen messenger mRNA. *Hypertension* 1988b; 11:591-596.
- **Cassis LA, Fettingner MJ, Roe AL, Shenoy UR, Howard G.** Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue. Angiotensin receptors in adipose tissue. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 396:39-47.
- **Chan JL, Blüher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS.** Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes*. 2002; 51:2105-2112.
- **Chapin DS, Lookingland KJ, Moore KE.** Effects of mobile phase composition on retention times for biogenic amines and their precursors and metabolites. *Currents Separations*. 1986; 7:68-70.

- **Chaytor AT, Martin PE, Edwards DH, Griffith TM.** Gap junctional communication underpins EDHF-type relaxations evoked by ACh in the rat hepatic artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280:H2441-H2450.
- **Chen H, Charlat O, Tartaglia LA.** Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell.* 1996; 84:491-495.
- **Chen SC, Kochan JP, Campfield LA, Burn P, Smeyne RJ.** Spice variants of the OB receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 1999; 19:245-266.
- **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ;** National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003; 289:2560-2572.
- **Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA.** Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hipertensión.* 1998; 31:643-648.
- **Christensen KL, Mulvany MJ.** Location of resistance arteries. *J Vasc Res.* 2001; 38:1-12.
- **Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K.** Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997; 278:1803-5.
- **Clancy RM, Abramson SB.** Acetylcholine prevents intercellular adhesion molecule 1 (CD54)-induced focal adhesion complex assembly in endothelial cells via a nitric oxide-cGMP-dependent pathway. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:2260-2264.
- **Cohen B, Novick D, Rubinstein M.** Modulation of insulin activities by leptin. *Science.* 1996; 274:1185-1188.
- **Cohen RA, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 1995; 92:3337-3349.

- **Cook JP, Rossitch E, Andon NA, Loscalzo J, Dzau VJ.** Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest*, 1991; 88:1663-1681.
- **Couce ME, Burguera B, Parisi JE, Jensen MD, Lloyd RV.** Localization of leptin receptor in human brain. *Neuroendocrinology* 1997; 66:145-150.
- **Cowling RT, Zhang X, Reese VC, Iwata M, Gurantz D, Dillmann WH, and Greenberg BH.** Effects of cytokine treatment on angiotensin II type 1A receptor transcription and splicing in rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1176–H1183.
- **Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Kral JG.** Developmental aspects of the adipose tissue renin-angiotensin system: therapeutic implications. *Drug Dev Res* 1994; 32:117–125
- **Crandall D.L, Armellino DC, Busler DE, McHendry-Rinde B. & Kral JG.** Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology* 1999; 140:154-158.
- **Crandall DL, Gordon G, Herzlinger HE, Saunders BD, Zolotor RC, Cervoni P, Kral JG.** Transforming growth factor alpha and atrial natriuretic peptide in white adipose tissue depots in rats. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22:676-80.
- **Cumin F, Baum HP and Levens N.** Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. *Int. J. Obes.* 1996; 20:1120–1126.
- **Cumin F, Baum HP, de Gasparo M and Levens N.** Removal of endogenous leptin from the circulation by the kidney. *Int. J. Obes.* 1997; 21:495–504.
- **da Cunha V, Tham DM, Martin-McNulty B, Deng G, Ho JJ, Wilson DW, Rutledge JC, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX.** Enalapril attenuates angiotensin II-induced atherosclerosis and vascular inflammation. *Atherosclerosis.* 2005; 178:9-17.
- **Darimont C, Vassaux G, Ailhaud G & Negrel R.** Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology.* 1994; 135:2030-2036.
- **Da-Wei, Yufang, Karas, Reitman.** Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, beta-3-adrenergic agonist and leptin. *J Biol Chem.* 1997; 272: 24129-24132.

- **Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC.** Structure, localitation and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE). *J Biol Chem.* 1997; 272:6823-6826.
- **Deng LY, Schiffrin EL.** Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1992; 5:817-822.
- **Deng C, Moinat M, Curtis L, Nadakal A, Preitner F, Boss O, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Giacobino JP.** Effects of β -adrenoceptor subtype stimulation of obese gene messenger ribomucleic acid and on leptin secretion in mouse brown adipocytes differentiated in culture. *Endocrinol.* 1997; 138, 548-552.
- **Denninger JW, Marletta MA.** Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411:334-350.
- **Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, White DW, Kalai M, Fountoulakis M.** Ligand- independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:18304-18310.
- **Devos R, Richards JG, Campfield LA, Tartaglia LA, Guisez Y, Van Der Heyden J, Tavernier J, Plaetinck G, Burn P.** OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93, 5668-5673.
- **Dickhout JG, Lee RM.** Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol,* 1998; 274: H794-800.
- **Dickhout JG, Lee RM.** Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997; 29:781-789.
- **Dickhout JG, Lee RM.** Increased medial smooth muscle cell length is responsible for vascular hypertrophy in young hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279:H2085- H2094.
- **Dickhout JG, Lee RM.** Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1998; 274:H794-H800.
- **Diederich D, Yang ZH, Buhler FR, Luscher TF.** Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive resistance arteries involve cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol.* 1990; 258:H445-H451.

- **DiGirolamo M, Fine JB, Tagra KR.** Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 1998; 274:R1460- R1467.
- **DiGirolamo M, Mendlinger S, Fertig JW.** A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol.* 1971;221:850–858.
- **Dinh DT, Fauman AG, Johnston CI, Fabiani ME.** Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond).* 2001; 100:482-492.
- **Doggrell SA, Brown L.** Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998; 39:89-105.
- **Dohi Y, Theil M, Bühler FR, Lüscher TF.** Activation of the endothelial L-arginine pathway in pressurized mesenteric resistance arteries: effect of age and hypertension. *Hypertension.* 1990; 15:170-175.
- **Dole VP, Meinertz H.** Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem.* 1960; 235:2595–2599.
- **Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S.** A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000; 87:E1-E9.
- **Dubrovskaja G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M.** Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol.* 2004; 286: H1107–H1113.
- **Dunbar JC, Hu Y, Lu H.** Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes.* 1997; 46, 2040-2043.
- **Dustan HP.** Pathophysiology of systemic hypertension. En: Hurst JW editor. The Heart, arteries and veins. *New York: McGraw Hill.* 1990: 1140-1150.
- **Dzau VI.** Significance of the vascular renin-angiotensin pathway. *Hypertension* 1986; 8:553-559.
- **Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH.** K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998; 396:269-272.

- **Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A.** A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*. 1997; 26:921-924.
- **Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A, Sharma AM.** Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens*. 1999; 17:555–560.
- **Engeli S, Négre R, Sharma AM.** Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000; 35:1270–1277
- **Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM.** The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35:807-825.
- **Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM.** Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 2005; 45:356-62.
- **Escobar E, Rodríguez-Reyna TS, Arrieta O, Sotelo J.** Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004; 2:1-15.
- **Faria AN, Ribeiro Filho FF, Gouveia Ferreira SR, Zanella MT.** Impact of visceral fat on blood pressure and insulin sensitivity in hypertensive obese women. *Obes Res*. 2002;10:1203–1206.
- **Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhaos C, Darnell R, Friedman JM.** () Anatomic localization of alternative spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94:7001-7005.
- **Feletou M, Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291:H985-1002.
- **Feletou M, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 1988; 93: 515-524.
- **Ferrario CM.** Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): An evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 2006; 47:515-521.

- **Ferrer M, Marín J, Encabo A, Alonso MJ, Balfagón G.** Role of channels and sodium pump in the vasodilation induced by acetylcholine, nitric oxide, and cyclic GMP in the rabbit aorta. *Gen Pharmacol.* 1999; 33:35-41.
- **Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG.** Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat. *Brain Res.* 2003; 964, 107-115.
- **Folkow B.** Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev.* 1982; 62: 347–504.
- **Folkow B, Hallback M, Lundgren Y, Weiss L.** Background of increased flow resistance and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand.* 1970; 80:93-106.
- **Folkow B.** Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22:S1-S6.
- **Fortuño A, Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Muñiz P, Salvador J, Diez J, Frühbeck G.** Leptin inhibits angiotensin II-induced intracellular calcium increase and vasoconstriction in the rat aorta. *Endocrinology.* 2002; 143:3555-3560.
- **Frederich Jr RC, Kahn BB, Peach MJ, Flier JS.** Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension.* 1992; 19:339–344.
- **Friedman JM.** Leptin, leptin receptor, and the control of body weight. *Nutr. Rev.* 1998; 56:38-46.
- **Frohlich ED.** Is the spontaneously hypertensive rat a model for human hypertension? *J Hypertens Suppl.* 1986; 4:S15-9.
- **Frohlich ED, Pfeffer MA.** Adrenergic mechanisms in human hypertension and in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci Mol Med.* 1975; 2:225s-238s.
- **Frühbeck G, Jebb SA and Prentice AM.** Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin. Physiol.* 1998; 18, 399–419.
- **Frühbeck G.** A heliocentric view of leptin. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 60: 301–318;
- **Frühbeck G.** Peripheral actions of leptin and its involvement in disease. *Nutr. Rev.* 2002; 60:S47–S55.
- **Frühbeck G.** Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes.* 1999; 48:903-908.

- **Frühbeck G.** Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* 2006; 393: 7–20.
- **Fujii K, Tominaga M, Ohmori S, Kobayashi K, Koga T, Takata Y, Fujishima M.** Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 1992; 70:660-669.
- **Fujii K, Ohmori S, Tominaga M, Abe I, Takata Y, Ohya Y, Kobayashi K, Fujishima M.** Age-related changes in endothelium-dependent hyperpolarization in the rat mesenteric artery. *Am J Physiol.* 1993; 265:H509-H516.
- **Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S.** Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int. Rev. Cytol.* 2003; 224: 1-27.
- **Gachhui R, Abu-Soud HM, Ghosha DK, Presta A, Blazing MA, Mayer B, George SE, Stuehr DJ.** Neuronal nitric-oxide synthase interaction with calmodulin-troponin C chimeras. *J Biol Chem.* 1998; 273:5451-5454.
- **Gachhui R, Presta A, Bentley DF, Abu-Soud HM, McArthur R, Brudvig G, Ghosha DK, Stuehr DJ.** Characterization of the reductase domain of fat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Calmodulin response is completa within the reductase domain itself. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:20594-20602.
- **Gálvez B, de Castro J, Herold D, Dubrovská G, Arribas S, Gonzalez MC, Aranguez I, Luft FC, Ramos MP, Gollasch M, Fernandez Alfonso MS.** Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1297-1302.
- **Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Lee RM.** Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res.* 2005; 13:687-692.
- **Gao YJ, Takemori K, Su LY, An WS, Lu C, Sharma AM, Lee RM.** Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res.* 2006; 71:363-73.
- **García-Cohen EC, Marín J, Díez-Picazo LD, Baena AB, Salaiques M, Rodríguez-Martínez MA.** Oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide causes vasoconstriction in the rat aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 293:75–81.

- **Garland JG, McPherson GA.** Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1992; 105:429–435.
- **Ghafourifar P, Richter C.** Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997; 418:291-296.
- **Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, Guerrieri M, Mantero F.** Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens.* 2002; 15:381–388.
- **Gibbons GH.** Endothelial dysfunction as a determinant of vascular function and structure: a new therapeutic target. *Am J Cardiol.* 1997; 79:3-8.
- **Giulivi C.** Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolites. *Biochem J.* 1998; 332:673-679.
- **Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M.** Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2005; 146:834-845.
- **Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM.** Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:14-18.
- **Gollasch M, Dubrovskaja G.** Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25:647-653.
- **González MC, Arribas SM, Molero F, Fernandez-Alfonso MS.** Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280:H2876-2881.
- **Gozelniak K, Engeli S, Janke J, Luft FC, Sharma AM.** Hormonal regulation of the human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens.* 2002; 20:965–973.
- **Greensmith JE, Duling BR.** Morphology of the constricted arteriolar wall: physiological implications. *Am J Physiol.* 1984; 247:H687-H698.
- **Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T.** Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 37:854-857.

- **Gryglewski RJ, Moncada S, Palmer RM.** Bioassay of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 1986a; 87:685-694.
- **Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S.** Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 1986b; 320:454-456.
- **Gutterman DD.** Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol*. 1999; 277:H1265-H1272.
- **Haller H.** Endothelial function: general considerations. *Drugs*. 1997; 53:1-10.
- **Harp JB, DiGirolamo M.** Components of the renin-angiotensin system in adipose tissue: changes with maturation and adipose mass enlargement. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995; 50:B270–B276.
- **Harvey J and Ashford MLJ.** Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology* .2003; 44: 845–854.
- **Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ.** The biology of white adipocyte proliferation. *Obesity Rev*. 2001; 2:239-254.
- **Havel PJ.** Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short- term and long- term regulation of food- intake and energy homeostasis. *Exp. Biol. Med.* 2001; **226**:963-977.
- **Havel PJ, Larsen PJ, Cameron JL.** Control on food intake. In *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Eds. *PM. Conn y ME. Freeman. Edit. Humana Press*. 2000
- **Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI.** Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*. 1997; 100:270–278.
- **Heaney ML and Golde DW.** Soluble hormone receptors. *Blood*. 1993; **82**:1945–1948.
- **Heagerty AM.** Changes in vascular morphology in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 1991; 5:3-8.
- **Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R.** Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol (Lond)*. 1994; 481:407-414.

- **Hegyi K, Fülöp K, Kovács K, Tóth S, Falus A.** Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol. Intern.* 2004; 28:159-169.
- **Henriksen JH, Holst JJ, Moller S, Andersen UB, Bendtsen F, Jensen G.** Elevated circulating leptin levels in arterial hypertension: relationship to arteriovenous overflow and extraction of leptin. *Clin Sci (Lond).* 2000; 99:527-534.
- **Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, Maclour J, Samuel JL, Levy BI, Michel JB.** Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2. *Br J Pharmacol.* 1997; 121:83–90.
- **Henrion D, Kubis N, Levy BI.** Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension.* 2001; 38:1150-1157.
- **Hirata M, Kohse KP, Chang CH, Ikebe T, Murad F.** Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1990; 265:1268-1273.
- **Hirsh J, Gallian E.** Methods for determination of adipose cell size and cell number in man and animals. *J Lipid Res.* 1968; 9:110 –119.
- **Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME.** The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 1998; 76:1405-1420.
- **Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS and Kahn B B.** Evidence for leptin binding proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes.* 1996; 45:1638–1643.
- **Houslay MD, Milligan G.** Tailoring cAMP-signaling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22:217-224.
- **Hwa JJ, Ghibaudi L, Williams P, Chatterjee M.** Comparison of acetylcholine-dependent relaxation in large and small arteries of rat mesenteric vascular bed. *Am J Physiol.* 1994; 266:H952-H958.
- **Iams SG, Wexler BC.** Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med.* 1979; 94:608-616.

- **Intengan HD, Schiffrin EL.** Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000; 36:312-318.
- **Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL.** Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999; 100:2267-2275.
- **Isse T, Ueta Y, Serino R, Noguchi J, Yamamoto Y, Nomura M, Shibuya I, Lightman SL, Yamashita H.** Effects of leptin on fasting-induced inhibition of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Brain Res*. 1999; 846:229-235.
- **Iwai N, Inagami T.** Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett*. 1992; 298:257-60.
- **Izzard AS, Bund SJ, Heagerty AM.** Increased wall-lumen ratio of mesenteric vessels from the spontaneously hypertensive rat is not associated with increased contractility under isobaric conditions. *Hypertension*. 1996; 28:604-608.
- **Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM.** Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*. 2002; 51:1699–1707.
- **Jackson WF, Konig A, Dambacher T, Busse R.** Prostacyclin-induced vasodilation in the rabbit heart is mediated by A TP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1993; 264:H238-H243.
- **Jiang N, He TC, Miyajima A and Wojchowski DM.** The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 β -receptor chimera. *J. Biol. Chem*. 1996; 271:16472–16476.
- **Johnson ML, Ely DL, Turner ME.** Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1992; 19:425-427.
- **Jones BH, Standridge MK & Moustaid N.** Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3–L1 and human adipose cells. *Endocrinology*. 1997; 138:1512-1519.

- **Jonsson JR, Game PA, Head RJ, and Frewin DB.** The expression and localisation of the angiotensin-converting enzyme mRNA in human adipose tissue. *Blood Press.* 1994; 3: 72–75.
- **Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR Jr, Murphy WR, Hockel GM.** Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1976; 38:21–29.
- **Kaplan NM.** «Hipertensión Clínica». Hipertension primaria: Patogenia. p. 56-135. Edición en español: Copyright 2003 Waverly Hispánica S.A/S.L.
- **Kaschina E, Unger T.** Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalin and function. *Blood Press.* 2003; 12:70-88.
- **Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernsber Ger P.** Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of leptin receptor. *Peptides.* 1999; 20:1449-1453.
- **Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W.** Activation of urocortin transport into brain by leptin. *Peptides.* 2000; 21:1811-1817.
- **Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A and Saruta T.** Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells *J. Hypertens.* 1991; 9:17–22.
- **Keidar S.** Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci.* 1998; 63:1-11.
- **Kershaw EE, Flier JS.** Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2548-56.
- **Kim S, Whelan J, Claycombe K, Reath DB, Moustaid-Moussa.** Angiotensin II Increases Leptin Secretion by 3T3-L1 and Human Adipocytes via a Prostaglandin-Independent Mechanism. *J Nutri.* 2002; 132:1135-1140.
- **Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG Jr.** Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem.* 2002; 277:41547-4155.
- **Kong JQ, Taylor DA, Fleming WW.** Mesenteric vascular responses of young spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; 258:13-7.
- **Kortelainen ML, Pelletier G, Ricquier D, Bukowiecki LJ.** Immunohistochemical detection of human brown adipose tissue uncoupling protein in an autopsy series. *J Histochem Cytochem.* 1993; 41:759-764.

- **Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C.** Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *J Surg Res.* 2005; 126:121-129.
- **Kourembanas S, Marsden PA, McMillan LP, Faller DV.** Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest,* 1991; 88:1054-1057.
- **Krumenaker JS, Hanafy KA, Murad F.** Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004; 62:505-515.
- **Kurtz TW, Morris RC.** Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1987; 10:127-131.
- **Lacy PS, Pilkington G, Hanvesakul R, Fish HJ, Boyle JP, Thurston H.** Evidence against potassium as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol.* 2000; 129:605-611.
- **Lafontan M, Berlan M.** Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown cell function. *J Lipid Res.* 1993; 34:1057–1091.
- **Lahera V, Navarro-Cid J, de las Heras N, Vázquez-Pérez S, Cediél E, Cachofeiro V.** Sistema Renina-Angiotensina. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. *ED Síntesis,* Pág: 1368-1384, Madrid, 2000.
- **Lahera V, Cediél E, de las Heras N, Vazquez-Perez S, Sanz-Rosa D, Vazquez-Cruz B, Cachofeiro V.** Endothelial dysfunction in hipertensión. *Nefrología.* 2003; 23:3-12.
- **Lane P, Gross SS.** Cell signaling by nitric oxide. *Seminars in nephrology.* 1999; 19:215-229.
- **Larsson H, Elmstahl S, Berglund G, Ahren B.** Evidence for leptin regulation of food-intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83:4382-4385.
- **Le Marquer-Domagala F, Finet M.** Comparison of the nitric oxide and cyclo-oxygenase pathway in mesenteric resistance vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1997; 121:588-594.
- **Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Davishzadeh JG, Lee Ji, Friedman JM.** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature Med.* 1996; 2:589-593.

- **Lee RMKW, Garfield RE, Forrest JB, Daniel E.** Morphometric study of structural changes in the mesenteric blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Blood vessels*, 1983b; 25:57-71.
- **Lee RMKW.** Vascular changes at the prehypertensive phase in the mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*. 1985; 22:105-126.
- **Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B.** Leptin induces direct vasodilatation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 2000; 49:293–297.
- **Li PF, Dietz R, Von Harsdorf R.** Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1997; 96:3602-3609.
- **Lincoln TM.** Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983; 224: 100-107.
- **Lindley SE, Gunnet JW, Lookingland KJ, Moore KE** 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid concentrations in the intermediate lobe and neural lobe of the posterior pituitary gland as an index of tuberohypophysial dopaminergic neuronal activity. *Brain Res*. 1990; 506:133-138.
- **Little TL, Xia J, Duling BR.** Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res*. 1995; 76:498-504.
- **Löllmann B, Grüninger S, Stricker-Krongrad A and Chiesi M.** Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and e in different mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997; 238:648–652.
- **Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR.** Distinct and specific functions of cGMP dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 1997; 22:307-312.
- **Löhn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM.** Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J*. 2002; 16:1057-1063.
- **Lopez-Jaramillo P, Pradilla LP, Bracho Y, Silva F.** The endocannabinoid system and its relation with central obesity and metabolic syndrome: therapeutic implications. *Rev. Col. Cardiol.*, set. 2005, vol.12, no.3, p.113-121. ISSN 0120-5633.

- **Lundin A, Rondahl H, Walum E and Wilcke M.** Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 ;1499:130–138.
- **Luscher TF, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent responses to platelets and serotonin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1986; 8:II55-II60.
- **Maack T.** Receptors of atrial natriuretic factor. *Anna Rev Physiol.* 1992; 54:11-27.
- **Madej T, Boguski MS and Bryant SH.** Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett.* 1995; 373:13–18.
- **Maeso R, Rodrigo E, Muñoz-García R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V.** Factors involved in the effects of losartan on endothelial dysfunction by aging in SHR. *Kidney Int.* 1998; 54: S30-S35.
- **Maicas C, Lázaro E, Alcalá J, Hernández P, Rodríguez L.** Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio,* 2003; V:141-160.
- **Marín J.** Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol.* 1993; 13:127–176.
- **Marín J, Rodríguez-Martínez MA.** Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 1997; 75:111–134.
- **Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulange A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M.** Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 2001; 15:2727-2729.
- **Mattei P, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S, Salvetti A.** Endothelial function in hypertension. *J Nephrol.* 1997; 10:192–197.
- **Matthias A, Richards SM, Dora KA, Clark MG, Colquhoun EQ.** Characterization of perfused periaortic brown adipose tissue from the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994; 72:344-352.
- **McGregor DD.** The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol.* 1965; 177:21-30.

- **McPherson GA, Keily SG, Angus JA.** Spasmolytic effect of cromakalim in dog coronary artery in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1991; 343:519–524.
- **Mehebig N, Jaubert A-M, Sabouralt D, Giudicelli Y and Ribi re C.** Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005; 289:C379–C387.
- **Mery PF, Lohmann SM, Fischmeister R.** Ca current is regulated by cyclic GMP dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:1197-1201.
- **Miki T, Taira M, Hockman S, Shimada F, Lieman J, Napolitano M, Ward D, Taira M, Makino H, Manganiello VC.** Characterization of the cDNA and gene encoding human PDE3B, the cGIP1 isoform of the human cyclic GMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase family. *Genomics.* 1996; 36:476-485.
- **Mombouli JV, Vanhoutte PM.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): Updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18:252-256.
- **Mombouli JV, Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:61-74.
- **Mombouli JV, Illiano S, Nagao T, Scott-Burden T, Vanhoutte PM.** Potentiation of endothelium-dependent relaxations to bradykinin by angiotensin I converting enzyme inhibitors in canine coronary artery involves both endothelium-derived relaxing and hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1992; 71:137-144.
- **Moncada S, Palmer RMJ, Gryglewski RJ.** Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1986; 83:9164-9168.
- **Moncada S, Palmer RM, Higgs EA.** Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-142.
- **Moncada S.** Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 1999; 92:164-169.

- **Montague CT, Farooqui S, Withehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ.** Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature*. 1997; 3:238-401.
- **Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S.** Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*. 1997; 46:342-7.
- **Mulvany MJ, Halpern W.** Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977; 41:19–26.
- **Mulvany MJ.** Control of vascular structure. *Am. J. Med*. 1993; 94:20S–23S.
- **Mulvany MJ.** Role of vascular structure in blood pressure development of the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*, 1986; 4:S61-S63.
- **Mulvany MJ, Aalkjaer C.** Structure and function of small arteries. *Physiol Rev*. 1990; 70:921-961.
- **Munzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T.** Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 874: 386-400.
- **Muoio DM and Dohm GL.** Peripheral metabolic actions of leptin. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002; 16:653–666.
- **Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T and Kishimoto T.** Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88:11349–11353 87.
- **Murakami T, Yamashita T, Lida M, Kuwajima M, Shima K.** A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1997; 231:26-29.
- **Nagao T, Illiano S, Vanhoutte PM.** Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *J Physiol Heart Circ Physiol*. 1992; 263:1090-1094.
- **Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest*. 1993; 92: 2867-2871.

- **Nakashima M, Vanhoutte PM.** Age-dependent decrease in endothelium-dependent hyperpolarizations to endothelin-3 in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; 22:S352-S354.
- **Nathan C, Xie QW.** Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell,* 1994; 78:915-918.
- **Nelson MT, Quayle JM.** Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995; 268:C799-C822.
- **Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, and Sraer J-D.** Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to rennin. *J Clin Invest.* 2002; 109:1417-27.
- **Nield TO, Keef K.** Measurements of the membrane potential of arterial smooth muscle in anesthetized animals and its relationship to changes in artery diameter. *Microvasc Rev.* 1985; 30:19-28.
- **Nielsen KC, Owman C.** Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 1971; 27:33-42.
- **Okamoto K, Aoki K.** Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japan Circ J.* 1963; 27:282-293.
- **Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y.** Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension.* 2003; 42:231-234.
- **Palatini P, Julius S.** Heart rate and the cardiovascular risk. *J Hypertens.* 1997; 15:3-17.
- **Palmer RMJ, Moncada S.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun,* 1989; 158:348-352.
- **Paul M, Mehr AP, Kreutz R.** Physiology of the renin-angotensin systems. *Phys Rev.* 2006; 86:747-803.
- **Paravicini TM, Touyz RM.** Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006; 71:247-58.
- **Pearson PJ, Vanhoutte PM.** Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1993; 122:1-67.

- **Peelman F, Waelput W, Iserentant H, Lavens D, Eyckerman S, Zabeau L, and Tavernier J.** Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Prog. Lipid Res.* 2004; 43:283.
- **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB.** Effect of the obese gene products on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* 1995; 269:540-543.
- **Perazella MA, Setaro JF.** Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol.* 2003; 10:184-196.
- **Phillips MI, Speakman EA, Kimura B.** Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept.* 1993; 43:1–20.
- **Pinterova L, Krizanova O, Zorad S.** Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. *Gen Physiol Biophys.* 2000; 19:329-334.
- **Pohl U, Busse R, Bassenge E.** Endothelial cell as oxygen sensor. En: Vanhoutte P.M. (Ed.) *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium.* Raven Press, Ltd., New York, 1988; 483-488.
- **Pond CM, Mattacks CA.** The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs. *Int J Obes.* 1991; 15:609–618.
- **Poredos P.** Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002; 32:274-277.
- **Pratt RE, Dzau VJ.** Trophic effects of angiotensin on blood vessels and heart. En *Renin Angiotensin System* (editores: Robertson JIS, Nicholas G) Raven Press, New York 1993; Pags: 31-1-31-7
- **Prolo P, Wong M and Licinio J.** Leptin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998; 30: 1285–1290.
- **Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A.** Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol.* 2000; 55:221-232.
- **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK Harrison DG.** Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increase vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.

- **Ravussin E.** Cellular sensors of feast and famine. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:1537–1540.
- **Ravussin E, Smith SR.** Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967:363-78.
- **Reaven GM, Chang H.** Relationship between blood pressure, plasma insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens.* 1991; 4:34 –38.
- **Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S.** Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990; 101:746-752.
- **Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA.** Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res.* 2001; 16:1426-33.
- **Rey FE, Pagano PJ.** The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1962-1971.
- **Rhodin.** En: Handbook of physiology the cardiovascular system, volumen II. Bohr, Somlyo, Sparks Editores. *American Physiological Society.* Bethesda, Maryland 1980.
- **Rioux F, Berkowitz BA.** Role of the thyroid gland in the development and maintenance of spontaneous hypertension in rats. *Circ Res.* 1977; 40:306-312.
- **Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E.** Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens.* 1994; 7:193-200.
- **Rodbell M.** Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* 1964; 239:375–380.
- **Rodriguez A, Fortuno A, Gomez-Ambrosi J, Zalba G, Diez J, Fruhbeck G.** The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology.* 2007; 148:324-331.
- **Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E.** The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006; 64:355-365.

- **Rubanyi GM, Lorenz RR, Vanhoutte PM.** Bioassay of endothelium-derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol*, 1985; 249:H95-H101.
- **Rubanyi GM, Vanhoutte PM.** Superoxide anions and hiperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 1986; 250:H822-H827.
- **Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J.** Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10: 321-329.
- **Sahu A.** Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on the energy homeostasis and leptin resistance. *Neuroendocrinology*. 2003; 24:225-253.
- **Sahu, A.** Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front. Neuroendocrinol*. 2004; 24, 225–253.
- **Saint-Marc P, Kozak LP, Ailhaud G, Darimont C, Negrel R.** Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation. *Endocrinology*. 2001; 142:487–492.
- **Sadow SL, Hill CE.** Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res*. 2000 18; 86:341-346.
- **Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél E, de Las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, Lahera V, Cachofeiro V.** Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: Role of NFkB/IkB system. *Am J Physiol*. 2005; 288:H111–H115.
- **Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, and Dzau VJ.** Cloning, characterization, and expresión of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1992; 185: 253-259.
- **Saye JA, Ragsdale NV, Carey RM, Peach MJ.** Localization of angiotensin peptide-forming enzymes of 3T3–F442A adipocytes. *Am J Physiol*. 1993; 264:C1570–C1576.
- **Scarpace PJ, Nicolson M, Matheny M.** UCP2, UCP3 and leptin gene expression: modulation by food restriction and leptin. *J Endocrinol*. 1998; 159:349-357.

- **Schiffrin EL:** Remodelado vascular en la hipertensión arterial, su importancia en la clínica. Lo nuevo y lo importante en hipertensión. *Boletín del Consejo Argentino de Hipertensión Arterial, Sociedad Argentina de Cardiología*, 1998, año 1, N° 2, pp 4-5.
- **Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P.** Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin Invest Med.* 1993; 16:177-186.
- **Schling P, Mallow H, Trindl A, Löffler G.** Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes.* 1999; 23:336-341.
- **Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic. Role of nitric oxide. *Hypertension.* 1998; 32:59-64.
- **Schwartz MW, Seeley RL, Campfield LA, Burn P, Baskin DG.** Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:1101-1106.
- **Schwartz MW, Woods SC, Porte JrD, Seeley RJ, Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nat.* 2000; 404:661-671.
- **Schwartz MW, Peskind E, Raskin M, Boyko EJ, Porte D Jr.** Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med.* 1996; 2:589-936.
- **Seidell JC, Bakker CJG, Van der Kooy K.** Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution: a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance. *Am J Clin Nutr.* 1990; 51: 953-957.
- **Serazin-Leroy V, Morot M, de Mazancourt P, Giudicelli Y.** Androgen regulation and site specificity of angiotensinogen gene expression and secretion in rat adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000; 279:E1398-E1405.
- **Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL.** Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1998; 16:457-466.
- **Sharma AM, Engeli S, Pischon T.** New Developments in Mechanisms of Obesity-induced Hypertension: role of Adipose Tissue. *Curr Hypert Reports* 2001; 3:152-156.

- **Shenoy U and Cassis L.** Characterization of renin activity in brown adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1997; 272: C989–C999.
- **Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaïke R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A.** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; 28:703-711.
- **Shuldiner AR, Yang R, and Gong DW.** Resistin, obesity and insulin resistance—the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345:1345.
- **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR.** Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science.* 1998; 281:1683-1686.
- **Simón E, Del Barrio AS.** Leptin and obesity. *Anales Sis San Navarra.* 2002; 25: 53-64.
- **Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J. Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW and Caro JF.** Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:1277–1282.
- **Sironi AM, Gastaldelli A, Mari A, Ciociaro D, Positano V, Buzzigoli E, Ghione S, Turchi S, Lombardi M, Ferrannini E.** Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. *Hypertension* 2004; 44:127-133.
- **Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial SEH-LELHA.** Guía sobre el diagnóstico y el tratamiento de la hipertensión arterial en España 2002. *Hipertensión.* 2002; 19:1-74.
- **Soltis EE, Cassis LA.** Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens* 1991; 275:681-692.
- **Somoza B, Gonzalez MC, Gonzalez JM, Abderrahim F, Arribas SM, Fernandez-Alfonso MS.** Modulatory role of the adventitia on noradrenaline and

- angiotensin II responses role of endothelium and AT₂ receptors. *Cardiovasc Res.* 2005; 65:478-486.
- **Smith TL, Hutchins PM.** Anesthetic effects on hemodynamics of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol.* 1980; 238:H539-44.
 - **Smith SC Jr, Clark LT, Cooper RS, Daniels SR, Kumanyika SK, Ofili E, Quinones MA, Sanchez EJ, Saunders E, Tiukinhoy SD;** American Heart Association Obesity, Metabolic Syndrome, and Hypertension Writing Group. Discovering the Full Spectrum of Cardiovascular Disease. Minority Health Summit 2003. Report of the Obesity, Metabolic Syndrome, and Hypertension Writing Group. *Circulation.* 2005;111:e134-9.
 - **St Lezin E, Simonet L, Pravenec M, Kurtz TW.** Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? *Hypertension.* 1992; 19:419-424.
 - **Stamler JS, Singel D.J, Loscalzo J.** Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992; 258:1898-1902.
 - **Stepniakowski KT, Goodfriend TL, Egan BM.** Fatty acids enhance vascular alpha-adrenergic receptor mediated pressor sensitivity. *Hypertension.* 1995; 25:774-778.
 - **Sunano S, Watanabe H, Tanaka S, Sekiguchi F, Shimamura K.** Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol.* 1999; 126:709-716.
 - **Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW.** In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 25: 1083-1089.
 - **Sweeney G.** Leptin signalling. *Cell. Signalling.* 2002; 14:655-663.
 - **Tanizawa Y, Okuya S, Ishihara H, Asano T, Yada T, Oka Y.** Direct stimulation of basal insulin secretion by physiological concentration of leptin in pancreatic beta cells. *Endocrinology.* 1997; 138:4513-4516.
 - **Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M y Delpón E.** Antagonistas de los receptores de la angiotensina II e insuficiencia cardiaca.

- Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales? *Rev Esp Cardiol.* 2006; 6: 10 – 24.
- **Tartaglia LA.** The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:6093-6096.
 - **Tartaglia LA, Dembski M, Weng S, Deng N, Culperer J, Devos R, Grayson JR, Campfield LA, Clark FT, Deeds J.** Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell.* 1995; 83:1263-1271.
 - **Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD.** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993; 45:205-251.
 - **Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression of a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33238–33243.
 - **Thomas WG, Mendelsohn FA.** Angiotensin receptors: form and function and distribution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35:774-779.
 - **Tomida T, Numaguchi Y, Nishimoto Y, Tsuzuki M, Hayashi Y, Imai H, Matsui H, Okumura K.** Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF_{2a} formation in L-NAME-treated rats. *J Hypertens.* 2003; 21:601–609.
 - **Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M.** Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res.* 1999; 36:311-320.
 - **Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV.** Leptin: fundamental aspects. *Int. J. Obes.* 1999; 23:22-28.
 - **Tschudi M, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T.** Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric arteries. *Hypertension.* 1996; 27:32-35.
 - **Tsuji T, Su C, Lee FJF.** Enhanced presynaptic beta-2-adrenoceptor mediated facilitation of the pressor responses in the prehypertensive SHR. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; 14:737-746.
 - **Unger RH.** The hyperleptinemia of obesity – regulator of caloric surpluses. *Cell.* 2004; 117:145–151.

- **Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A.** Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1996; 100: 2793-2799.
- **Ushio-Fukai M, Zuo L, Ikeda S, Tojo T, Patrushev NA, Alexander RW.** cAbl tyrosine kinase mediates reactive oxygen species- and caveolin-dependent AT1 receptor signaling in vascular smooth muscle: role in vascular hypertrophy. *Circ Res.* 2005; 97:829-836.
- **Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK.** p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:23317-23321.
- **Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell Jr JE, Stoffel M, Friedman JM .** Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wild-type and *ob/ob* mice but not *db/db* mice. *Nat. Genet.* 1996; 14:95-97.
- **Vanelli G, Chang HY, Gatensby A G, Hussain SNA.** Contribution of potassium channels to active hyperemia of the canine diaphragm. *J Appl Physiol.* 1994; 76:1098-1105.
- **Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P.** Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes.* 1998; 47:913-917.
- **Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1996; 14:S83-S93.
- **Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S.** Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005; 144:449-458.
- **Vanhoutte PM.** Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension.* 1989; 13:658-667.
- **Vanhoutte PM.** Platelets, endothelium-derived vasoactive factors, and coronary disease. *Cardiologia.* 1992; 37:89-93.
- **Vázquez-Pérez S, Navarro-Cid J, De Las Heras N, Cediél E, Sanz-Rosa D, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V.** Relevance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the effects of hypertension on rat coronary relaxations. *J Hypertens.* 2001; 19: 539-545.

- **Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G.** Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 2002; 51:168-173.
- **Vecchione C, Aretini A, Maffei A, Marino G, Selvetella G, Poulet R, Trimarco V, Frati G, Lembo G.** Cooperation between insulin and leptin in the modulation of vascular tone. *Hypertension*. 2003; 42:166-170.
- **Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang S-Y, Essine K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M.** Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*. 2004; 44:271–276.
- **Virdis A, Schiffrin EL.** Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003; 12:181–187.
- **Watt PA, Thurston H.** Endothelium-dependent relaxation in resistance vessels from the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1989; 7:661-666.
- **Wauters M, Considine RV, Yudkin JS, Peiffer F, De Leeuw I, Van Gaal LF.** Leptin levels in type 2 diabetes: associations with measures of insulin resistance and insulin secretion. *Horm. Metab. Res*. 2003; 35:92-96.
- **Weiss D, Sorescu D, Taylor WR.** Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2001; 87: 25C-32C.
- **White R, Hiley CR.** A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1997; 122:1573-1584.
- **Williams KV, Mullen M, Lang W, Considine RV, Wing RR.** Weight loss and leptin changes in individuals with type 2 diabetes. *Obes. Res*. 2003; 7:155-163.
- **Williams MJ, Hunter GR, Kekes-Szabo T, Snyder S, Treuth MS.** Regional fat distribution in women at risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65:855-860.
- **Widlansky ME, Price DT, Gokce N, Eberhardt RT, Duffy SJ, Holbrook M, Maxwell C, Palmisano J, Keaney JF Jr, Morrow JD, Vita JA.** Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension*. 2003; 42:310– 315.

- **Wu CC, Hong HJ, Chou TC, Ding YA, Yen MH.** Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 228:459–466.
- **Yamamoto Y, Imaeda K, Suzuki H.** Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *J Physiol.* 1999; 514:505-513.
- **Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K.** Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes.* 1997; 46: 1077-1080.
- **Yang G, Ge H, Boucher A, Yu X, Li C.** Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor. *Mol Endocrinol.* 2004; 18:1354-1362.
- **Youngstrom TG, Bartness TJU.** White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol* 1998; 275:R1488-R1493.
- **Youngstrom TG, Bartness TJ.** Chatecholaminergic innervation of white adipose tissue in the Siberian hamster. *Am J Physiol.* 1995; 268: R744–R751.
- **Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW.** C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:972-978.
- **Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK.** Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1998; 32:488-495.
- **Zagotta WN, Siegelbaum SA.** Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev Neurosci.* 1996; 19:235-263.
- **Zang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM).** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372:425-432.
- **Zerrouk A, Auguet M, Chabrier PE.** Augmented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 31:525– 533.

- **Zhang Y, Ji H, Fabucci ME, Falconetti C, Zheng W, Sandberg K.** Translational control of the rat angiotensin type 1a receptor by alternative splicing. *Gene*. 2004; 341: 93–100.
- **Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA.** Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J. Clin. Invest.* 1998; 102:869-873.
- **Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar- Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE.** Leptin induces insulin-like signalling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:11348-11354.
- **Zhao AZ, Huan J-N, Gupta S, Pal R and Sahu A.** A phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat. Neurosci.* 2002; 5: 727–728
- **Zorad S, Dou J, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J, Saavedra JM** Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPAR γ . *European Journal of Pharmacology*. 2006; 552:112-122.

PUBLICACIONES

Perivascular Adipose Tissue and Mesenteric Vascular Function in Spontaneously Hypertensive Rats

Beatriz Gálvez, Javier de Castro, Diana Herold, Galyna Dubrovska, Silvia Arribas, M. Carmen González, Isabel Aranguéz, Friedrich C. Luft, M. Pilar Ramos, Maik Gollasch, Maria S. Fernández Alfonso

Objective—Perivascular adipose tissue of normotensive rats releases a transferable factor that induces relaxation by opening voltage-dependent K^+ (K_v) channels. The relevance of these observations to hypertension is unknown.

Methods and Results—We characterized mesenteric perivascular adipose tissue from 3-month-old Wistar Kyoto rats (WKY) and aged-matched spontaneously hypertensive rats (SHR). Mesenteric bed (MB) weight and MB total lipid content were lower in SHR than in WKY. Freshly isolated MB adipocytes were smaller in SHR. Plasma triglycerides, glycerol, nonesterified free-fatty acids, and cholesterol were also lower in SHR. Plasma and mesenteric leptin were correlated with the quantity of mesenteric fat. To study vascular function, the MB was cannulated and perfused at a constant 2 mL/min flow. The K_v channel blocker 4-aminopyridine (4-AP; 2 mmol/L) increased perfusion pressure less in SHR MB than WKY and was directly correlated with the mesenteric fat amount. In isolated mesenteric artery rings, 4-AP (2 mmol/L) induced a contractile effect that was attenuated in SHR compared with WKY. The anticontractile effects of perivascular fat were reduced in SHR mesenteric artery rings compared with WKY.

Conclusions—Differences in visceral perivascular adipose tissue mass and function may contribute to the increased vascular resistance observed in SHR. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:000-000.)

Key Words: perivascular adipose tissue ■ ADRF ■ mesenteric arteries ■ SHR

Earlier studies uncovered a paracrine role for adipose tissue in the regulation of vascular function. Soltis and Cassis¹ demonstrated that perivascular fat significantly attenuated vascular responsiveness of aortic rings to norepinephrine. More recent reports confirmed the inhibitory action of perivascular fat on aortic² and mesenteric³ contractile response to a variety of vasoconstrictors. The anticontractile action is induced by an undefined transferable factor released by periadventitial adipocytes, called adipocyte-derived relaxant factor (ADRF).² ADRF is released from rat aortic periadventitial tissue by a calcium- and cAMP-dependent mechanism.⁴ The anticontractile effect is mediated by opening of ATP-dependent K^+ channels in the aorta² and by activation of vascular smooth muscle voltage-dependent K^+ (K_v) channels in mesenteric arteries.³ The mesenteric vascular smooth muscle cell (VSMC) resting membrane potential is more hyperpolarized in arterial rings surrounded by fat than in rings without fat. Furthermore, the anticontractile effect is directly dependent on the amount of fat.³ These findings support the notion that perivascular fat contributes to the maintenance of basal tone in mesenteric arteries and to the

regulation of mesenteric artery contractility by K_v channel activation.³ Adipocyte-derived leptin also influences vascular tone.⁵⁻⁷ Pharmacological experiments showed that leptin induces a direct vasodilatation in aorta and mesenteric arteries.⁶ Interestingly, the vasodilatory effect of leptin on mesenteric arteries is attributable to VSMC membrane hyperpolarization,⁶ which is likely caused by activation of K^+ channels and release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. Because the mesenteric bed (MB) is surrounded by high but variable amounts of perivascular white adipose tissue, changes in the amount of fat may have consequences for the regulation of mesenteric artery tone and systemic arterial blood pressure. We tested the hypothesis that visceral perivascular adipose tissue contributes to differences in vascular resistance in hypertension and analyzed the possible relationship between the amount and function of perivascular fat and hypertension.

Methods

Animals

Experiments were conducted in 3-month-old male Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR; 300 to 350 g;

Original received December 8, 2005; final version accepted March 16, 2006.

From the Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid (B.G., M.S.F.-A.), Departamento de Biología Celular, Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain (J.C., M.P.R.); Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (S.A., C.G.), Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (I.A.), and HELIOS Klinikum Berlin, Franz Volhard Clinic, Medical faculty of the Charité, Berlin, Germany (D.H., G.D., F.L.), Medical Clinic for Nephrology and Intensive Care, Medical faculty of the Charité, Berlin, Germany (M.G., G.D., D.H.).

Correspondence to Maria S. Fernández-Alfonso, Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar Paseo Juan XXIII, nº 1 28040, Madrid, Spain. E-mail marisoff@farm.ucm.es

© 2006 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000220381.40739.dd

Charles River; Barcelona, Spain) maintained under controlled light (12-hour light/dark cycles from 8:00 AM to 8:00 PM) and temperature (22°C to 24°C) conditions. The rats were fed a normal rat chow (A.04; Panlab) and had free access to tap water. The institutional animal care and use committee approved all experimental procedures according to European Community guidelines. Systolic and diastolic blood pressure was recorded directly in a group of animals under anesthesia (sodium pentobarbital 50 mg/kg). Because anesthesia might influence adipose tissue metabolism and lipid parameters, another group of animals was killed by decapitation and blood was collected in EDTA. Plasma samples were frozen in aliquots for biochemical determinations. The mesentery was rapidly separated from the intestine, weighed, and its volume was determined plethysmographically. Wet weight and volume were referred to rat body weight. The mesentery was then placed in a warm (37°C) solution of Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, for adipocyte isolation or in cold (4°C) oxygenated (95% O₂/5% CO₂) physiological salt solution (PSS) for functional studies.

Isolation of Adipocytes

Adipocytes were prepared from mesenteric white adipose tissue according to the method of Rodbell with minor modifications.⁸ Briefly, mesenteric adipose tissue was cut into small pieces and digested with collagenase A (1 mg/mL) in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4, containing 4% (wt/vol) BSA (fatty acid free, fraction V) and 5.5 mmol/L glucose (KRB buffer) at 37°C in a O₂/CO₂ (19:1) atmosphere with a continuous vigorous shaking (60 cycles/min). Subsequently, fat cells were dispersed and filtered through a silk screen, washed 3 times with KRB buffer to eliminate collagenase, and were resuspended in the same buffer. The size of the fat cell was measured by direct microscopic determination, and the mean adipocyte diameter was calculated from measurements of 100 cells per animal. Because adipocytes have 95% lipid content and are spherical in shape, their volume and weight can be estimated from their diameter.⁹ Total cell lipid content was determined gravimetrically after organic extraction,¹⁰ and the number of fat cells was calculated by dividing the total lipid weight by the mean cell weight.

Leptin Determination and Plasma Analysis

For leptin determination and plasma analysis, please see the online supplement, available at <http://atvb.ahajournals.org>.

Vascular Reactivity in the MB

The mesenteric vascular bed was perfused as described previously.¹² Briefly, the superior mesenteric artery was cannulated at its junction with the abdominal aorta, put on a platinum grid in an organ chamber, and perfused using a peristaltic pump (Ismatec) at constant flow (2 mL/min) with oxygenated (95% O₂-5% CO₂) PSS of the following composition: 115 mmol/L NaCl, 4.6 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L NaHCO₃, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.2 mmol/L MgSO₄, 0.01 mmol/L EDTA, 11 mmol/L glucose, 5 × 10⁻⁶ mol/L indomethacin, and 3 × 10⁻⁶ mol/L dexamethasone to avoid induction of inducible NO synthase. Perfusion pressure was determined continuously by a pressure transducer (Grass) and recorded on a polygraph (Grass) for the rest of the experiment. A bubble trap system removed any air bubbles in the perfusate. Because flow was maintained at a constant rate, changes in perfusion pressure were used as an index of changes artery resistance, and an increase or decrease in the perfusion pressure indicated either vasoconstriction or vasodilatation, respectively. After an equilibration period of 60 minutes and before starting the experiment, the vascular MB was contracted with 75 mmol/L KCl to assess contractility. Subsequently, the MB was contracted with noradrenaline (10⁻⁷ μmol/L), and acetylcholine (10⁻⁹ to 10⁻⁵ mmol/L) was added to functionally confirm the presence of the endothelium. In control experiments, contractility to 75 mmol/L of KCl increased with perfusion pressure but reached a plateau at ≈2 mL/min. At any given flow rate, contractility was similar in WKY and SHR.

TABLE 1. Blood Pressure, Body Weight, and Adipose Tissue Characteristics in 3-Month-Old Male WKY and SHR (90 ± 7 days)

	WKY	SHR
Systolic blood pressure, mm Hg	131 ± 4	179 ± 8*
Diastolic blood pressure, mm Hg	95 ± 6	136 ± 6*
Rat body weight, g	315 ± 4	320 ± 9
Mesenteric weight, mg/g	12 ± 0.4	10 ± 0.4*
Mesenteric volume, L/g	12 ± 0.1	11 ± 0.3*
Mesenteric density, g/L	0.97 ± 0.1	0.96 ± 0.03
Lumbar adipose tissue, mg/g	8 ± 0.3	5 ± 0.4*

Data are expressed as mean ± SEM of 12 determinations per strain. **P* < 0.05 between groups.

Vascular Reactivity in Mesenteric Arteries

Superior mesenteric artery or their first-order branches were cut in 2-mm segments. Periadventitial fat and connective tissue was either left intact, (+) fat rings, or removed, (-) fat rings with scissors.³ Rings were mounted in PSS buffer at 37°C in a small vessel myograph (Danish Myotechnology) at standard pretension of 1.12 mN/mm (1.98 mN/1.76 mm; 3) or at a higher tension equivalent to that generated at 0.9 × the diameter of the vessel at 100 mm Hg (ie, ≈2 mN/mm in WKY and 1.7 mN/mm in SHR).¹³ Segments were threaded onto 2 stainless wires and suspended in 5-mL microvascular myograph baths (Danish Myotechnology) according to Mulvany and Halpern.¹⁴ The arteries were equilibrated for 60 minutes, and then they were exposed to isomolar 60 mmol/L KCl-containing solution (KPSS) to ensure their viability and contractility. KPSS was similar to PSS except that NaCl was exchanged with equimolar KCl. After PSS washing, the vessels were subjected to the following protocols. In the first series of experiments, a cumulative concentration-effect curve to serotonin (10⁻⁸ to 7 × 10⁻⁶ mol/L) was generated for each vessel. In the second series of experiments, the effect of serotonin was investigated in rings pretreated with the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine (4-AP). The effects were compared with contractions to 2 μmol/L serotonin 10 minutes before addition of 4-AP. In addition, cumulative concentration-effect curves to leptin, the K⁺ channel opener cromakalim, and the thromboxane receptor agonist U46619 were generated for each vessel. In all experiments, a separate vessel segment from each individual was simultaneously monitored as control vessel. Tension was expressed as a percentage of the steady-state tension (100%) obtained with isotonic external KCl (60 mmol/L).

Statistical Analysis

All values are given as mean ± SEM. Student *t* tests or ANOVA were used as appropriate. A value of *P* < 0.05 was considered statistically significant; *n* represents the number of data.

Results

Mesenteric Fat Depot Characteristics

As shown in Table 1, SHR had higher systolic and diastolic blood pressures compared with WKY. MB wet weight and volume were significantly lower in SHR than in WKY, without differences in body weight or MB density. The lumbar fat pad weight was also significantly lower in SHR, indicating that changes in adipose tissue were not specific for mesenteric fat. The mean diameter of freshly isolated adipocytes (supplemental Figure 1a and 1b, available online at <http://atvb.ahajournals.org>) was significantly greater in WKY (36.9 ± 3 μm) compared with SHR (26.9 ± 4.3 μm), whereas the cell number was not different between strains (WKY = 80 ± 39 million cells/g tissue; SHR = 107 ± 31 million

TABLE 2. Metabolic and Hormonal Parameters of WKY and SHR Rats

	WKY	SHR
Plasma triglycerides, mg/dL	145.1±12	94±5**
Plasma glycerol, μmol/L	264±17	203±19*
Plasma NEFA, μmol/L	621.7±91.2	309.2±27.2**
Plasma total cholesterol, mg/dL	65.3±3.1	53±0.8**
Plasma insulin, μg/L	2.6±0.3	1.6±0.4*
Plasma glucose, mg/dL	136±4.7	130±5.8
Plasma leptin, ng/mL	11.5±2.2	7.6±1.0*
Mesenteric leptin, pg/mg protein	324±48	80±12*

Data are expressed as mean±SEM of 6 determinations per strain. * $P<0.05$; ** $P<0.001$ between groups.

NEFA indicates nonesterified free-fatty acids.

cells/g tissue). Because the population of mature adipocytes includes cells of variable size,¹⁵ we also analyzed the size distribution, which was shifted to the left in SHR, confirming that adipocytes were smaller in this strain (supplemental Figure 1c and 1d). Furthermore, mesenteric total lipid content was significantly lower in SHR (43 ± 8 g lipid/100 g tissue) than in WKY (69 ± 8 g lipid/100 g tissue; $P<0.05$), indicating a reduced amount of SHR visceral fat.

Biochemical Analysis

Table 2 summarizes the metabolic and hormonal parameters. No glucose differences were observed between strains. However, the insulin concentration was significantly lower in SHR compared with WKY. SHR had lower circulating triglyceride, glycerol, nonesterified free-fatty acid, and cholesterol concentrations than WKY. Moreover, both plasma and mesenteric leptin levels were significantly reduced in SHR and were correlated with the quantity of mesenteric fat ($P<0.05$).

Vascular Reactivity in the Perfused MB

We used whole perfused MB to assess whether or not differences in perivascular fat between WKY and SHR influence vascular function. Basal perfusion pressure at 2 mL/min was similar between strains (WKY= 6.9 ± 0.6 mm Hg; SHR= 7.1 ± 0.6 mm Hg). Because mesenteric fat controls arterial function through ADRF by K_v channel activation,³ we analyzed the effect of the blocker 4-AP. The increase in perfusion pressure induced by 2 mmol/L 4-AP was greater in WKY than SHR (Figure 1a). A significant correlation was observed between the amount of mesenteric fat and the contraction elicited by 4-AP (2 mmol/L; Figure 1b). KCl (75 mmol/L) induced a similar increase in perfusion pressure between strains (Figure 1c).

Although functional effects of mesenteric perivascular fat in normotensive rats were reported to be not dependent on NO,³ we analyzed the effect of basal NO production on vascular tone by perfusion with the nonspecific NO synthase inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester. N^G -nitro-L-arginine methyl (0.1 mmol/L) induced an increase in perfusion pressure that was not different between strains (WKY= 1.6 ± 0.3 mm Hg; SHR= 2 ± 0.5 mm Hg). In addition, acetylcholine produced a similar decrease in MB perfusion pressure in WKY and SHR (results not shown), indicating no differences in endothelium-dependent relaxation.

Vascular Reactivity in Mesenteric Arteries

Contractile responses were analyzed in isolated mesenteric artery rings with (+) fat and without (-) fat (supplemental Figure II). We first used standard vessel wall pretensions of 1.12 mN/mm, which give maximal force development in mesenteric rings of normotensive rats.³ At this pretension, the response to 60 mmol/L KCl was similar in rings from both strains, independent of fat (supplemental Figure IIIa). To analyze the ADRF contribution to mesenteric tone, rings were incubated with 4-AP. The contractile effect of 4-AP

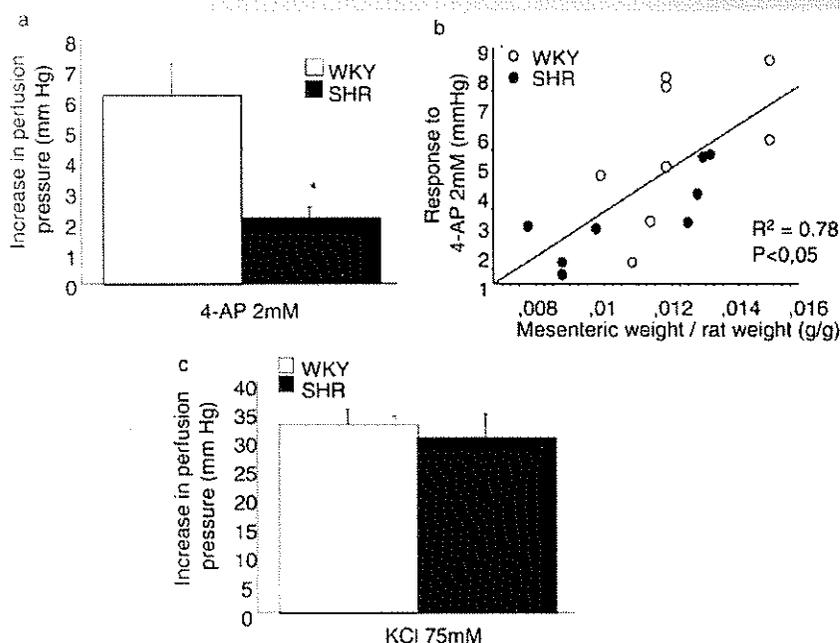


Figure 1. a, Response to 2 mmol/L 4-AP in the perfused MB from WKY and SHR. b, Correlation between contraction to 4-AP in perfused MB from WKY and SHR and perivascular fat. c, Response to KCl 75 mmol/L in perfused MB from WKY and SHR. Contraction is expressed as increase in perfusion pressure in mm Hg. Data are shown as mean±SEM of 6 to 10 determinations per strain. * $P<0.05$ between groups.

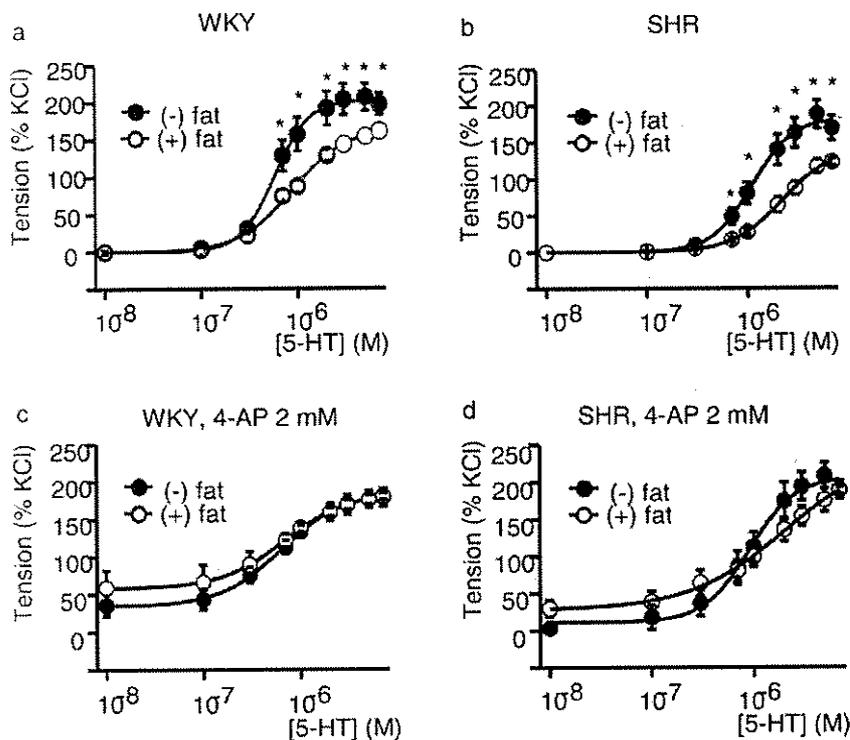


Figure 2. a and b, Cumulative concentration-response curves to (10^{-8} to 7×10^{-6} M) serotonin (5-HT) in intact (+) fat mesenteric arteries (○) and (-) fat mesenteric arteries without periadventitial fat (●) of WKY (a) and SHR (b; $n \geq 4$ each). c and d, Cumulative concentration-response curves to (10^{-8} to 7×10^{-6} M) 5-HT in intact (+) fat mesenteric arteries without periadventitial fat (○) and (-) fat mesenteric arteries without periadventitial fat (●) of WKY (c) and SHR (d) in the presence of 2 mmol/L 4-AP ($n \geq 4$ each). Rings were mounted at resting tension of 1.12 mN/mm. *Significant with $P < 0.05$.

(2 mmol/L) was similar in (-) fat rings of both WKY and SHR rats (supplemental Figure IIIb). In contrast, 4-AP (2 mmol/L) significantly increased resting tension only in (+) fat rings from WKY rats (supplemental Figure IIIb). Moreover, concentration-response curves to serotonin were performed in absence and presence of 4-AP. The force generated by serotonin alone was less in (+) fat compared with (-) fat rings in both WKY and SHR (Figure 2a and 2b). This difference disappeared after preincubation with 4-AP (2 mmol/L; Figure 2c and 2d).

We next performed isometric contraction experiments at a vessel pretension equivalent to that generated at $0.9 \times$ the diameter of the vessel at 100 mm Hg (in the range of 2 mN/mm in WKY and 1.7 mN/mm in SHR). In mesenteric rings from WKY, the response to 60 mmol/L KCl was similar to the KCl response at a 1.12 mN/mm vessel pretension. However, in mesenteric rings from SHR, contraction to 60 mmol/L KCl was ≈ 3 -fold stronger compared with that

induced at 1.12 mN/mm pretensions. In both strains, contractions to KCl at this pretension were independent of the fat presence. Under these conditions, serotonin induced lower contractions in (+) fat rings compared with (-) fat rings from WKY but not from SHR (Figure 3a and 3b).

We next analyzed a possible difference in the arterial smooth muscle response to a putative hyperpolarizing factor released from adipose tissue. For this purpose, we used the synthetic K^+ channel opener cromakalim. Cromakalim produced dose-dependent relaxations of (-) fat mesenteric arterial rings of both WKY and SHR rats. The EC_{50} values were not different between the 2 groups (WKY = 44.6 ± 11.7 nmol/L; SHR = 41.3 ± 11.3 nmol/L; $n = 13$), indicating that the WKY and SHR arterial smooth muscle sensitivity to membrane hyperpolarization was similar. This observation was confirmed using a vasoconstrictor that acts independently on smooth muscle potential changes in mesenteric artery rings, such as U46619.³ U46619 induced contractions in rings of

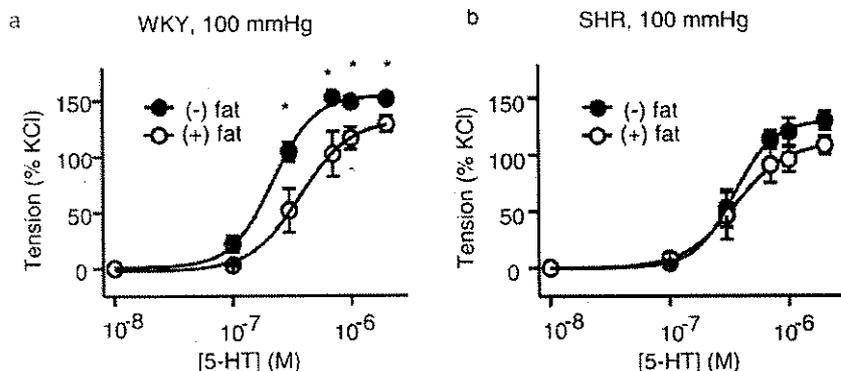


Figure 3. Cumulative concentration-response curves to (10^{-8} to 2×10^{-6} M) serotonin (5-HT) in intact (+) fat mesenteric arteries (○) and (-) fat mesenteric arteries without periadventitial fat (●) of WKY (a) and SHR (b; $n \geq 4$ each). Rings were mounted at a tension equivalent to that generated at $0.9 \times$ the diameter of the vessel at 100 mm Hg. *Significant with $P < 0.05$.

WKY and SHR rats, independent of perivascular fat (supplemental Figure IV).

We also analyzed the vasodilatory response to leptin in (+) fat and (-) fat WKY and SHR mesenteric arterial rings. Leptin produced dose-dependent relaxations in rings of both strains, irrespective of periadventitial fat (supplemental Figure V). However, the sensitivity to leptin was higher in mesenteric arteries from SHR (EC_{50} : [-] fat = 2.7 ± 1.0 pmol/L; [+] fat = 2.9 ± 1.1 pmol/L) compared with WKY (EC_{50} : [-] fat = 11.7 ± 5.8 pmol/L; [+] fat = 11.2 ± 4.3 pmol/L).

Discussion

The main finding in our study is that alterations in visceral perivascular fat mass and function may contribute to the increased vascular resistance in a hypertensive model. We found that SHR have less mesenteric perivascular adipose tissue with smaller adipocytes and a lower total lipid and leptin content compared with WKY. The lower amount of adipose tissue facilitates contraction in mesenteric arteries, likely attributable to a diminished paracrine regulation of perivascular fat on mesenteric arterial tone via K_v channels.

White adipose tissue is an endocrine organ that produces and releases numerous factors with a broad biological activity, including vasoactive factors such as ADRF²⁻⁴ and leptin.¹⁶ The mesenteric vascular bed, which significantly contributes to total peripheral vascular resistance, is surrounded by a considerable and variable amount of fat. Because fat inhibits vascular tone of small mesenteric arteries via K_v channels,³ and because abdominal visceral fat mass is directly correlated with the prevalence of hypertension,¹⁷ we chose the MB as experimental model to characterize the contribution of periadventitial fat to vascular resistance in hypertension.

The MB from SHR had a lower weight and volume compared with WKY. This difference was attributable to a reduced perivascular fat mass from smaller adipocytes with a lower total lipid content but without changes in cell number. One possible explanation might be increased sympathetic outflow in SHR,^{18,19} leading to an enhanced lipolysis.^{20,21} In rat adipocytes, catecholamines control lipid mobilization and lipolysis via β_3 -adrenoceptors that activate adenylate cyclase, cAMP-dependent protein kinase, and hormone sensitive lipase. This signaling results in the hydrolysis of triacylglycerols and decreased adipocyte cell size.²² This mechanism is of special importance for the mesenteric adipose tissue because of its dense sympathetic innervation.²³ Moreover, catecholamine-stimulated lipolysis is more effectively inhibited by insulin in adipocytes from the mesentery and omentum than in other depots.²⁴ Thus, the diminished plasma insulin levels in the SHR also favors catecholamine-stimulated lipolysis in mesenteric and lumbar fat depots in this strain.

We next tested the hypothesis that the mesenteric perivascular adipose tissue contributes to the maintenance of vascular tone in SHR. Because this fat controls arterial function by K_v channel activation in normotensive rats,³ we analyzed the effect of 4-AP, a K_v channel inhibitor, on the isolated MB perfusion pressure and on isolated mesenteric artery tone,

with (+) fat and without (-) perivascular fat. The fact that 4-AP induced (1) an increase in MB perfusion pressure, (2) a basal contractile effect, and (3) increased serotonin-induced contractions in isolated mesenteric rings provides evidence for an anticontractile effect of perivascular fat through 4-AP-sensitive K_v channels in both WKY and SHR. The anticontractile effect of perivascular fat correlated with the amount of mesenteric fat as shown previously³ but was greater in WKY. Moreover, in mesenteric rings with the same amount of perivascular fat, 4-AP also induced higher contractions in WKY. These findings suggest that both the morphological and functional changes in SHR mesenteric perivascular fat might contribute to the increased basal mesenteric arterial tone and vascular resistance via K_v channels. In fact, the reported differences in the response to 4-AP between strains can be specifically attributed to an anticontractile effect of perivascular fat for the following reasons: (1) they were not dependent on a differential VSMC sensitivity to membrane hyperpolarization; (2) they were not related to unspecific mechanical effects caused by differences in the mesenteric fat mass; and (3) they cannot be attributed to differences in endothelial-dependent dilatation or in contractile capacity of the vessels because of blood pressure. An interesting finding that requires further characterization is that the anticontractile effect of perivascular fat in SHR seems to be dependent on the wall pretension and is more evident at wall pretensions equivalent to $0.9 \times$ the diameter of the vessel, which are closer to the wall tension "in vivo" for each strain.

Because mesenteric leptin was lower in SHR correlating with the lower amount of fat in this strain and because leptin elicits vasodilation through hyperpolarization in mesenteric arteries,⁶ the possibility exists that a lower leptin level might contribute to the increased contractile responses in SHR. The lack of leptin antagonists did not allow us to directly investigate the involvement of leptin. Haynes et al have shown that leptin increases thermogenic sympathetic nerve activity, suggesting a direct leptin effect on sympathetic nerve traffic.²⁵ We did not explore nerve traffic in our experiments. However, because the vasodilatory effects of leptin did not depend on the presence of periadventitial adipose tissue, we suggest that the lower perivascular leptin levels might be responsible for the diminished anticontractile effects of perivascular fat and that they may play a role in vascular dysfunction in SHR. On the other hand, the increased sensitivity of SHR rings to leptin suggests a compensatory mechanism in this strain that precludes judgments as to the net effect.

SHR are not only a hypertensive model but also model the insulin-resistance syndrome with hypertriglyceridemia and glucose intolerance.²⁶ Nevertheless, our SHR strain had lower lipid concentrations than WKY. We performed the plasma extraction in the morning, and the values represent postprandial concentrations because we did not fast the animals. We avoided 24-hour fasting because fasting stimulates lipid mobilization and lipolysis. Both processes reduce mesenteric perivascular adipose tissue. Therefore, our results suggest that the SHR vascular dysfunction was independent of carbohydrate and lipoprotein metabolism perturbations. Furthermore, the functional abnormalities of abdominal fat associ-

ated with lower perivascular fat content might play a role in the development or maintenance of high blood pressure in this strain. Whether or not similar results can be observed in other hypertensive strains or species remains to be determined.

In conclusion, we demonstrated that functional abnormalities in the visceral mesenteric fat of SHR are associated with lower amount of perivascular adipose tissue, smaller adipocytes, and lower lipid content. The findings seem contradictory in terms of obesity-related hypertension.²⁷ Whether or not obese models or overweight patients are resistant to the vascular anticontractile effect of adipose tissue-derived factors should be explored. A possible shift in the balance between adipose tissue-derived vasodilator and vasoconstrictor factors in obesity warrants investigation, particularly because ADRF appears to be absent in a model of obesity.²⁸

Acknowledgments

This work was supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-05180; BFI 2001-0638; BFI 2003-03455, PM99/011), Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0558/2004), and Deutsche Forschungsgemeinschaft Go766/8-1. Beatriz Gálvez is a fellow from Universidad Complutense de Madrid

References

- Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens*. 1991;275:681-692.
- Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J*. 2002;16:1057-1063.
- Verloren S, Dubrovská G, Tsang S-Y, Essine K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*. 2004;44:271-276.
- Dubrovská G, Verloren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol*. 2004;286:H1107-H1113.
- Frühbeck G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. *Diabetes*. 1999;48:903-908.
- Lembo G, Vecchione C, Fratta L, Marino G, Trimarco V, d'Amati G, Trimarco B. Leptin induces direct vasodilatation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 2000;49:293-297.
- Fortuño A, Rodríguez A, Gomez-Ambrosi J, Muñoz P, Salvador J, Diez J, Frühbeck G. Leptin inhibits angiotensin II-induced intracellular calcium increase and vasoconstriction in rat aorta. *Endocrinology*. 2002;143:3555-3560.
- Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*. 1964;239:375-380.
- Hirsh J, Gallian E. Methods for determination of adipose cell size and cell number in man and animals. *J Lipid Res*. 1968;9:110-119.
- Dole VP, Meinertz H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem*. 1960;235:2595-2599.
- Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*. 1972;97:142-145.
- McGregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor responses in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J Physiol*. 1965;177:21-30.
- Garland JG, McPherson GA. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1992;105:429-435.
- Mulvaany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977;41:19-26.
- DiGirolamo M, Mendlinger S, Fertig JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol*. 1971;221:850-858.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413-437.
- Faria AN, Ribeiro Filho FF, Gouveia Ferreira SR, Zanella MT. Impact of visceral fat on blood pressure and insulin sensitivity in hypertensive obese women. *Obes Res*. 2002;10:1203-1206.
- Frohlich ED, Pfeffer MA. Adrenergic mechanisms in human hypertension and in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci Mol Med*. 1975;2:225s-238s.
- Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, Quartieri F, Moschini L, Cavazzini S, Cavatorta A, Borghetti A. Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;36:656-661.
- Youngstrom TG, Bartness TJ. White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol*. 1998;275:R1488-R1493.
- Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev*. 2002;2:239-254.
- Lafontan M, Berlan M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown cell function. *J Lipid Res*. 1993;34:1057-1091.
- Youngstrom TG, Bartness TJ. Chatecholaminergic innervation of white adipose tissue in the Siberian hamster. *Am J Physiol*. 1995;268:R744-R751.
- Pond CM, Mattacks CA. The effects of noradrenaline and insulin on lipolysis in adipocytes isolated from nine different adipose depots of guinea-pigs. *Int J Obes*. 1991;15:609-618.
- Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*. 1997;100:270-278.
- Reaven GM, Chang H. Relationship between blood pressure, plasma insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens*. 1991;4:34-38.
- Fernandez-Alfonso MS. Regulation of vascular tone: the fat connection. *Hypertension*. 2004;44:255-256.
- Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Lee RM. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res*. 2005;13:687-692.