



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EFFECTO DE LEPTINA Y ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN
DE MOLÉCULAS DE INFLAMACIÓN EN ENDOTELIO DE
RATA OBESA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

CRUZ MARTÍNEZ MARÍA DE LOURDES

ASESOR: DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR

COASESOR: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos la: Tesis

Efecto de leptina y estrógenos sobre la expresión de moléculas de inflamación en endotelio de rata obesa

Que presenta la pasante: María de Lourdes Cruz Martínez

Con número de cuenta: 304018385 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de abril de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Luisa Martínez Aguilar	
VOCAL	Dr. Marco Antonio Vega López	
SECRETARIO	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
1er. SUPLENTE	Dr. Francisco López Mejía	
2do. SUPLENTE	M. en C. Lidia Rangel Trujano	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por haberme brindado una valiosa formación académica y humana.

A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mi directora de tesis, Dra. Leticia Manuel Apolinar por su inagotable apoyo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito. Gracias por sus consejos personales y académicos. Al Dr. Arturo Zarate Treviño por su apoyo incondicional y por ver en mí un futuro profesional.

A mis compañeras Lety y Miriam. A mi amigo y compañero Beto quienes han sido parte de esta fase de investigación y experimento, me han enseñado el valor de un equipo.

Dra. Elvia Mera Jiménez por darme la enseñanza del buen hacer y el cuidado de cada detalle. Por su paciencia, amabilidad y amistad.

También me gustaría agradecer a mis profesores durante toda mi carrera profesional porque todos han aportado un granito de arena en mi formación, y en especial a la profesora Ana Laura Vázquez Martínez y Ladislao Palomar, por sus consejos, su enseñanza y amistad.

Al comité que integra el jurado Dra. Luisa Martínez Aguilar, Dr. Marco Antonio Vega López, Dr. Salvador Fonseca Coronado, Dr. Francisco López Mejía, M. en C. Lidia Rangel Trujano por sus valiosas sugerencias. Gracias por todo su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera.

A mis padres, como un testimonio de cariño y eterno agradecimiento por mi existencia, valores morales y formación profesional. Porque se han sacrificado gran parte de su vida para formarme y nunca podré pagar todos sus desvelos, ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por lo que soy y por todo el tiempo que les robé pensando en mí.

A mis hermanos: Ángel, Jaime, Hilario, Nino, Noé, Ema, Guadalupe y Margarita quienes son el motivo y la razón para seguir superándome día a día. Gracias por su comprensión y amor

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENDOCRINOLOGÍA, DIABETES Y METABOLISMO, CMN SIGLO XXI, IMSS. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ARTURO ZARATE, INVESTIGADOR NACIONAL EMERITO SNI E IMSS Y DE LA DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR INVESTIGADOR ASOCIADO B DEL IMSS.

ÍNDICE

Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Abreviaturas.....	III
Resumen	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fisiología del endotelio vascular	3
1.2. Disfunción endotelial relacionada a la obesidad	10
1.3. Tejido adiposo	12
1.4. Leptina	14
1.5. Acción de los estrógenos en la función endotelial	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Modelo experimental.....	25
5.2. Cultivo primario de células endoteliales de aorta de rata	25
5.3. Determinación colorimétrica de óxido nítrico.....	27
5.4. Cuantificación de proteínas	27
5.5. <i>Western blot</i>	28
5.6. Análisis estadístico	29
6. RESULTADOS	
6.1. Modelo experimental de obesidad.....	30
6.2. Cultivo celular de endotelio.....	31
6.3. Cuantificación de óxido nítrico	31

6.4. Expresión de COX-2 mediante <i>Western blot</i>	33
6.5. Expresión de ICAM-1 mediante <i>Western blot</i>	34
6.6. Determinación de receptores de adiponectina en CE de hembras por <i>Western blot</i>	35
6.7. Determinación de receptores de adiponectina en CE de machos por <i>Western blot</i>	36
6.8. Determinación de la expresión del receptor OB-Rb de leptina en CE de rata	37
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de los vasos sanguíneos y ubicación del endotelio	3
Figura 2.	Células endoteliales.	4
Figura 3.	Relajación de músculo liso vascular dependiente del endotelio.....	7
Figura 4.	Vías que intervienen en la vasodilatación y vasoconstricción vascular	9
Figura 5.	La disfunción endotelial como paso inicial evolutivo de la aterosclerosis	11
Figura 6.	Eventos iniciales en la formación de la estría grasa	12
Figura 7.	Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado proinflamatorio	13
Figura 8.	La leptina producida en el adipocito regula el apetito a nivel cerebral y estimula el gasto energético.....	15
Figura 9.	Isoformas del receptor de la leptina.....	16
Figura 10.	Vías de señalización del receptor de la leptina.	18
Figura 11.	Fisiopatología molecular de la liporregulación	20
Figura 12.	Mecanismo de acción de los receptores de estrógenos.....	22
Figura 13.	Peso corporal de ratas Wistar controles (C) y obesas (OB).....	30
Figura 14.	Comparación en la acumulación de tejido adiposo en rata Wistar	30
Figura 15.	Microfotografías de cultivo de células endoteliales de aorta de rata.....	31
Figura 16.	Determinación de óxido nítrico en sobrenadante de cultivo endotelial aórtico	32
Figura 17.	Expresión proteica de COX-2 en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar	33
Figura 18.	Expresión proteica de ICAM-1 en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar	34
Figura 19.	Expresión proteica de receptores de adiponectina en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar hembras.....	35
Figura 20.	Expresión proteica de receptores de adiponectina en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar macho.....	36
Figura 21.	Expresión proteica del receptor OB-Rb de leptina en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar... ..	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades de las células endoteliales	5
Tabla 2. Nomenclatura y características generales de las NOS	8
Tabla 3. Curva estándar de proteínas.....	28
Tabla 4. Proteínas y anticuerpos utilizadas en la técnica de <i>Western blot</i>	29

ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA carboxilasa
AA	Ácido araquidónico
ACO	Acetil CoA oxidasa
Adipo R1	Receptor de adiponectina R1
Adipo R2	Receptor de adiponectina R2
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	Cinasa activada por monofosfato de adenina
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Albumina sérica bovina
CBP	Proteína de enlace de CREB
CE	Células endoteliales
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPT-1	Carnitin-palmitoil transferasa
CREB	Proteína de enlace de elemento de respuesta de AMPc
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Acido desoxirribonucleico
ERs	Receptores de estrógenos
ET-1	Endotelina-1
eNOS	Sintasa del óxido nítrico endotelial
FAS	Sintetasa de ácidos grasos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina
FRDE	Factor relajante derivado del endotelio
FMN	Mononucleótido de flavina
FNII	Dominio 2 de Fibronectina
FNIII	Dominio 3 de Fibronectina
GC	Guanilato ciclasa
GTP	Guanosina 5-trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IAM	Infarto agudo de miocardio
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular-1
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
JAK	Vía Janus cinasa
kDa	KiloDalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N-mono-metil-L-arginina

MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
min	Minuto
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NF-κB	Factor nuclear de transcripción de la cadena kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
OB	Obeso
OB-Rb	Receptor de la leptina forma larga
ONOO⁻	Peroxinitrito
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PI-3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PGI₂	Prostaciclina
PPARγ	Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas
RAW 264 7	Línea celular de macrófagos obtenida a partir de la infección a ratones Balb/c por virus causantes de la leucemia.
RIPA	Solución amortiguadora de lisis para células
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SRC-1	Coactivador del receptor de esteroides 1
SREBP-1c	Proteína transportadora del elemento regulador de esteroides
SSF	Solución salina fisiológica
STAT	Activador de la vía de la transcripción
TAB	Tejido adiposo blanco
TAM	Tejido adiposo marrón
TBS	Solución amortiguadora Tris-salina
THB	Tetrahidrobiopterina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
vWF	Factor de Von Willebrand

RESUMEN

La incidencia de la obesidad va en aumento, por lo cual es importante analizar los efectos de moléculas derivadas del tejido adiposo como son las adipocinas, entre las que destacan la leptina y la adiponectina, vinculadas a trastornos metabólicos que son causa de eventos cardiovasculares relacionados a la disfunción endotelial. Además, la obesidad desencadena un proceso inflamatorio donde se incrementa la expresión de ICAM-1 y COX-2 en las células del endotelio vascular. Sin embargo, el mecanismo molecular de la inflamación y la producción de óxido nítrico (NO), mediante la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) con las adipocinas, no está bien definido. Por otra parte, se ha demostrado que los estrógenos inducen la expresión de eNOS que inhibe la expresión de las moléculas proinflamatorias.

El propósito del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de daño endotelial en rata obesa y la participación de los estrógenos como posibles reguladores del tono vascular, para sugerir un mecanismo con posible efecto protector en la disfunción endotelial.

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos de 21 días de edad, que fueron divididas en dos grupos control (C) y obeso (OB). El grupo C fue alimentado *ad libitum* con alimento para ratas, para el grupo OB el alimento fue mezclado con grasa de cerdo. A los 18 meses de edad se disectó la aorta torácica y se separó el endotelio para realizar un cultivo de células endoteliales (CE), que al 90 % de confluencia fue tratado con leptina 10^{-8} M y estradiol 10 nM o 100 nM durante 48h, para comparar los niveles de expresión de ICAM-1, COX-2 y de los receptores de adipocinas OB-Rb, Adipo R1 y Adipo R2 mediante *Western blot*, así como la producción de NO por una técnica colorimétrica.

En las ratas sometidas a una dieta hipercalórica se encontró un aumento del peso corporal en ambos sexos ($p < 0.01$). El cultivo de CE de ratas macho estimulado con estradiol 10 nM mostró una mayor producción de NO, y disminuyó en las hembras ($p < 0.001$). La expresión de COX-2 e ICAM-1 presentaron un aumento con estradiol 100 nM, en ambos sexos. Los receptores AdipoR1 y Adipo R2 incrementaron en hembras con estradiol 100 nM. El receptor OB-Rb incremento con estradiol 10 nM, en ambos sexos. Estos resultados sugieren que el estradiol tiene un posible efecto protector de daño endotelial, el cual es dependiente del sexo y parece ser mayor en hembras.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad puede ser definida como un estado en la que el exceso acumulado de grasa corporal es de tal magnitud, que la salud se ve afectada. Se considera una epidemia global, y constituye uno de los principales problemas de salud pública mundial (Córdova *et al.*, 2010).

La prevalencia de la obesidad está aumentando rápidamente. Aunque el porcentaje de población afectada varía de un país a otro, en general, es elevado y se considera que en los próximos años la mayor parte de la población será obesa o, al menos, presentará sobrepeso (Manzur *et al.*, 2010).

La obesidad y el sobrepeso son el principal problema de salud pública en México, pues nuestro país ocupa el primer lugar mundial con obesidad, afectando en mayor cantidad a las mujeres que a los hombres. La obesidad, entre otros factores, está estrechamente asociada con un mayor riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular (Barrera *et al.*, 2013).

Aunque la etiología de la obesidad es compleja, se considera que es el resultado de la combinación de factores genéticos, una alimentación inadecuada (especialmente la ingestión hipercalórica) y la falta de actividad física (Manzur *et al.*, 2010).

Una de las principales características de la obesidad es la presencia de procesos inflamatorios crónicos, al existir un incremento en el tamaño y el número de adipocitos se genera una disfunción que se refleja en una mayor producción de citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda y factores angiogénicos, que en parte son responsables del proceso inflamatorio (De Ferranti *et al.*, 2008).

El tejido adiposo contribuye a regular el metabolismo de los lípidos y la homeostasis energética. Actualmente es reconocido como un órgano endócrino que secreta citocinas y hormonas llamadas “adipocinas”, que en condiciones fisiológicas tienen un papel primordial en la homeostasis (De Ferranti *et al.*, 2008). Una de estas adipocinas es la leptina, hormona de 16 kDa que modula el apetito y el gasto energético (Zhang *et al.*, 1994). Tiene efectos pleiotrópicos, que incluyen la regulación del peso corporal, la reproducción, el crecimiento, la

respuesta inmune, el tono vascular y la estimulación de la angiogénesis y se considera una citocina pro-inflamatoria (Fernández *et al.*, 2010).

La leptina ejerce sus funciones biológicas al unirse con sus receptores celulares, que están codificados por el gen *ob*, localizado en el cromosoma 7 en el humano. El receptor de leptina OB-Rb, activa la vía de señalización JAK-STAT a nivel intracelular (Fruhbeck, 2006).

Otra adipocina importante producida por el tejido adiposo es la adiponectina, cuyos principales efectos son anti-inflamatorios, anti-aterogénicos y participa en la sensibilidad a la insulina, su actividad está mediada por los receptores Adipo R1 y Adipo R2 y su asociación con la obesidad es inversa a la de la leptina (Elisondo *et al.*, 2008).

Los procesos inflamatorios que se observan en estados de obesidad son inducidos, en parte, por la leptina, y han sido asociados a disfunción endotelial y aterosclerosis (Fernández *et al.*, 2010). Sin embargo, aún quedan por definir los mecanismos que conducen a la disfunción endotelial y la influencia que pueden tener otras hormonas, entre ellas los estrógenos, sobre el proceso inflamatorio en la obesidad y su asociación a factores de riesgo cardiovascular (Tchernof, 2004).

La incidencia de enfermedades cardiovasculares es mayor en hombres que en mujeres premenopáusicas de la misma edad, lo cual se ha asociado a la mayor cantidad de estrógenos producidos por el género femenino. Se ha demostrado que los estrógenos tienen un efecto protector contra las dislipidemias; también tienen efectos en la regulación del tono vascular, la angiogénesis y protegen de daños a las células endoteliales (CE) (Campos *et al.*, 2005). Algunos estudios mencionan que el estradiol induce a la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS), que da lugar a la producción de óxido nítrico, el cual participa impidiendo la agregación y adhesión a la pared vascular de células inflamatorias, por lo anterior, el estradiol está directamente relacionado con procesos anti-inflamatorios de protección al endotelio (Tchernof, 2004).

En la actualidad se busca profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la obesidad y existe controversia respecto a la terapia de sustitución hormonal como medio de prevención de la enfermedad cardiovascular y la regulación de la función endotelial.

1.1. Fisiología del endotelio vascular

La primera descripción de la circulación sanguínea fue realizada por William Harvey en el año 1628. En 1800 von Reckinghaus estableció que los vasos sanguíneos no eran solamente túneles perforados a través de los tejidos, sino que están constituidos por células especializadas. Los estudios con microscopía electrónica de las paredes de los vasos, realizados por Gowan en 1959, describían la interacción entre los linfocitos y el endotelio de las vénulas, permitiendo visualizar al endotelio como un órgano dinámico, heterogéneo y diseminado, que posee funciones de secreción vital, metabólica e inmunológicas (Kordich, 2006).

Actualmente se acepta que el endotelio vascular es una delgada capa de células que tapiza la cara interior de los lechos vasculares (Figura 1) y tiene un papel fundamental en la regulación de la circulación sanguínea (Sánchez *et al.*, 2011). Se ha reconocido como el órgano más extenso e importante del cuerpo, está estratégicamente ubicado entre la sangre y los tejidos, formando una barrera dinámica y funcional (Campos *et al.*, 2005).

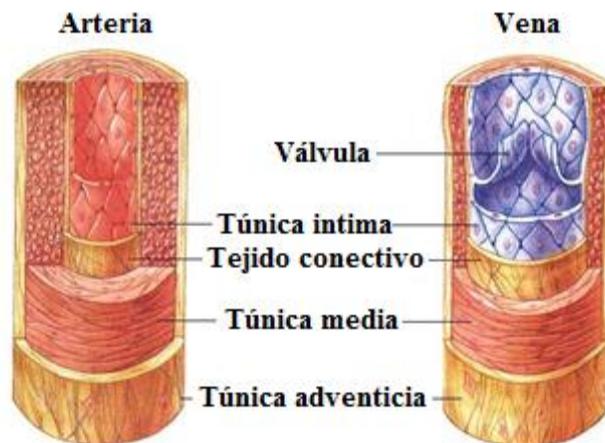


Figura 1. Estructura de los vasos sanguíneos y ubicación del endotelio. Las paredes de las arterias y venas tienen 3 capas: la túnica adventicia (formada por tejido conjuntivo fibroso), la túnica media (formada por tejido muscular liso) y la túnica íntima (formada por el endotelio) (Shier *et al.*, 1996).

La superficie que cubre el endotelio en un adulto humano está compuesta aproximadamente de 1 a 6×10^{13} células, con un peso aproximado de 1 kg, que cubre un área aproximada de 7 m^2 . Las CE desempeñan un papel importante en la homeostasis de la sangre, regulan el flujo de sustancias nutritivas, de diversas moléculas biológicas y de las células sanguíneas (Calderón, 2012).

El endotelio está constituido por CE poliédricas, con un sistema de uniones intracelulares. Las CE poseen en su citoplasma inclusiones llamadas cuerpos de Weibel-Palade; estas estructuras contienen el Factor de Von Willebrand (vWF) (factor VIII de la cascada de coagulación) que tiene un peso molecular entre 220 y 225 kDa (Ross, 2008).

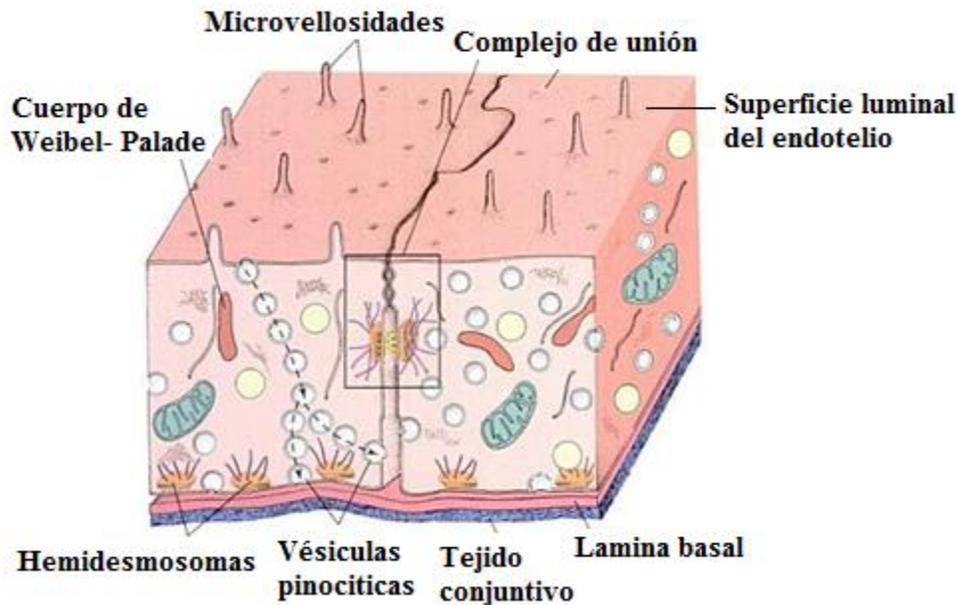


Figura 2. Células endoteliales. Obsérvese la organización del citoplasma donde los cuerpos de Weibel-Palade constituyen una característica de las CE (Ross, 2008).

Las propiedades de las CE cambian en respuesta a diversos estímulos, este proceso, conocido como activación endotelial, también es responsable de la patogenia de muchas enfermedades vasculares, por ejemplo la aterosclerosis. Las CE activadas expresan moléculas de adhesión en su superficie, producen citocinas, factores de crecimiento, moléculas vasoconstrictoras, vasodilatadoras y moléculas que controlan la coagulación de la sangre. En la Tabla 1 se muestran las principales características de las CE (Ross, 2008).

Tabla 1. Propiedades de las células endoteliales (Ross, 2008).

Propiedades principales	Función asociada	Moléculas activas que intervienen
Mantenimiento de una barrera de permeabilidad selectiva	Endocitosis	LDL, transferrina, colesterol, factores de crecimiento, anticuerpos
Control de la trombosis	Secreción de protrombógenos	Factor von Willebrand, inhibidor del activador del plasminógeno. Heparina.
Modulación del flujo sanguíneo	Vasoconstrictores	Endotelina, enzima convertidora de angiotensina, tromboxano
	Vasodilatadores	Factor de relajación derivado del endotelio, NO, prostaciclina.
Participación en el metabolismo de las lipoproteínas	Producción de radicales libres	Lipoproteín lipasa Quilomicrones, VLDL e IDL.
Regulación de la proliferación celular	Secreción de factores estimulantes de crecimiento.	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
	Secreción de factores inhibidores de crecimiento.	Factor de crecimiento transformante.
Regulación de respuestas inmunitarias	Regulación de la migración de los leucocitos por la expresión de moléculas de adhesión.	ICAM, VCAM, Selectinas e Integrinas.

Funciones del endotelio

El endotelio interviene en procesos de embriogénesis, histogénesis, organogénesis, cicatrización, capta señales químicas, físicas e inmunes y cumple funciones específicas en la salud y la enfermedad (Davignon *et al.*, 2004). Una de sus funciones primordiales es la producción de moléculas que cumplen importantes eventos en la homeostasis vascular (Campos *et al.*, 2005). A continuación se detallan algunas funciones:

- a) **Regulación del tono vascular.** Se lleva a cabo mediante la producción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Dentro de las primeras, el óxido nítrico (NO) es una molécula sintetizada por el endotelio, con efectos anti-aterogénicos, anti-inflamatorios y anti-trombóticos. Otra sustancia reguladora es la prostaciclina I₂ (PGI₂) que fue la primera que se describió como derivada del endotelio, es el principal producto de las CE y proviene del ácido araquidónico (AA). Posee una acción antiagregante plaquetaria a través de la activación de la adenilciclasa que aumenta el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en los vasos sanguíneos y plaquetas (Archipoff *et al.*, 1991; Loscalzo, 1995).

Por otra parte, las CE sintetizan también compuestos vasoconstrictores como: tromboxano A₂, angiotensina II y endotelina-1 (ET-1), que son los contribuyentes principales en el mantenimiento de la tensión arterial (Hochstätter *et al.*, 2006).

- b) **Modulación del crecimiento celular.** Se ejerce mediante la producción de los factores de crecimiento plaquetario, de crecimiento fibroblástico y de crecimiento insulinoide 1 (Badimón *et al.*, 2012).

- c) **Modulación de la inflamación:** Mediante la producción de moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, las cuales participan en la migración de leucocitos; el NO neutraliza la función de moléculas (Hochstätter *et al.*, 2006).

- d) **Regulación de la trombosis.** La relación de plaquetas, endotelio y factores de coagulación tienden a mantener la fluidez de la sangre a través del equilibrio que se conoce como “hemostasia”. El endotelio participa en el proceso anticoagulante a través de la síntesis de PGI₂, NO y heparán sulfato; de fibrinólisis con la generación del activador tisular del plasminógeno, del inhibidor del activador del plasminógeno, del vWFy del factor tisular (Badimón *et al.*, 2012).

Mediadores vasoactivos

El endotelio se considera como un órgano parácrino, dado que produce y libera una gran cantidad de factores con efectos contráctiles y relajantes que actúan sobre la pared vascular subyacente (Sánchez *et al.*, 2011).

Óxido nítrico

En el año 1980, Furchgott, Ignarro y Murad describieron de forma independiente que el "Factor Relajante Derivado del Endotelio" o FRDE era el mismo NO producido por las CE y que participaba en el mantenimiento del tono muscular de los vasos sanguíneos (Hochstätter *et al.*, 2006).

El NO es un gas lipofílico e hidrosoluble que realiza una serie de funciones relacionadas con la homeostasis vascular: tiene actividad vasodilatadora, regula el tono de los vasos, participa en la inhibición de la agregación plaquetaria, en la inhibición de la adhesión, proliferación y migración de células musculares lisas. Es un importante regulador fisiológico del sistema cardiovascular, nervioso e inmune; los macrófagos activados sintetizan grandes cantidades de NO el cual media la destrucción de microorganismos (Murad, 2006).

Los efectos fisiológicos del NO fluctúan, se encuentran en el rango picomolar a micromolar, por su naturaleza gaseosa se difunde rápidamente (no se almacena) y su vida media es corta (5 segundos) por lo cual su cuantificación directa es difícil (Centelles *et al.*, 2004). Está asociado a las alteraciones que inducen disfunción endotelial, enfermedad coronaria, hipertensión, shock séptico, inflamación, demencia, disfunción eréctil, trastornos neurológicos, diabetes, autismo, cáncer y enfermedades relacionadas con la edad (Knott, 2010).

Síntesis del óxido nítrico

El NO se sintetiza en el endotelio e impide que las células vecinas se ensanchen para poder controlar la presión sanguínea. Una vez producido el NO se transmite a la parte muscular de la arteria y la relaja, produciendo su dilatación (Figura 3) (Centelles *et al.*, 2004).

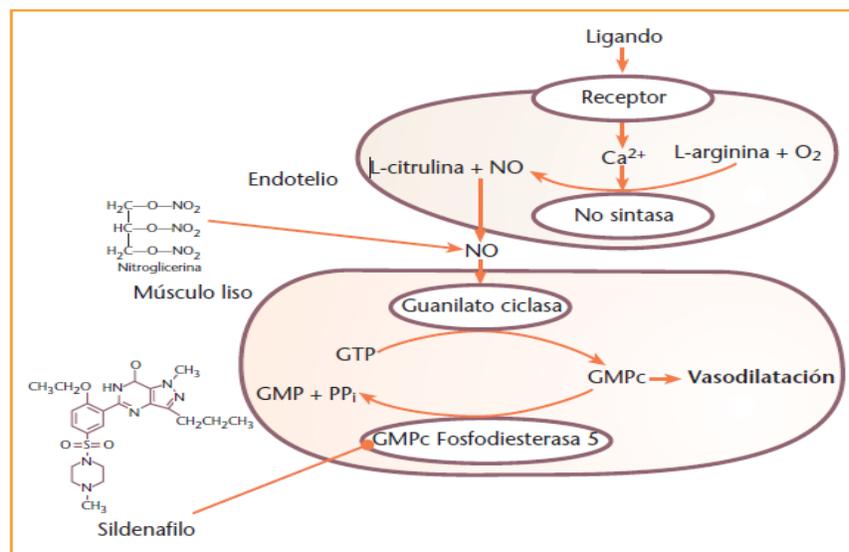


Figura 3. Relajación de músculo liso vascular dependiente del endotelio. El NO activa la guanilciclase soluble para formar cGMP, éste activa la proteína cinasa dependiente produciendo la disminución del calcio del citosol, la desfosforilización de la cadena liviana de la miosina y la relajación muscular (Centelles *et al.*, 2004).

Su precursor es la L-arginina, la cual es llevada al interior de la célula endotelial por un transportador específico, generándose una molécula de L-citrulina y una molécula de NO; todo esto es catalizado por la sintasa de óxido nítrico (NOS), se conocen tres isoformas descritas en la Tabla 2 (Centelles *et al.*, 2004).

Tabla 2. Nomenclatura y características generales de las NOS (Centelles *et al.*, 2004)

Isoforma	Nomenclatura Descriptiva	Localización	Expresión	Requerimiento de Ca ⁺⁺	Características
NOS 1 155 kDa	nNOS bNOS	Neuronas del SNC y SNP, islotes de páncreas	Constitutiva	Si	Sintetiza cantidades bajas de NO (pmol). Cumple funciones de señalización celular
NOS 2 125kDa	iNOS	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos.	Inducible	No	Sintetiza cantidades altas de NO (µmol). Se expresa en diversos tipos celulares, principalmente macrófagos y CE. Cumple funciones citotóxicas y citoprotectoras.
NOS 3 135kDa	eNOS	Endotelio	Constitutiva /variable	Si	Cumple funciones de señalización celular.

Para la síntesis del NO, además del sustrato L-arginina, se requiere de calcio-calmodulina y de 4 cofactores: mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavina-adenina (FAD), tetrahidrobiopterina (THB) y nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH). Esta reacción puede ser inhibida por derivados estructurales de la L-arginina, como la N-mono-metil-L-arginina (L-NMMA) y el N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), entre otros (Ferrer *et al.*, 1998).

Bajo la acción de algunas hormonas el endotelio produce el NO, el calcio liberado por la proteína calmodulina aumenta la NOS, lo cual incrementa los niveles del NO que viaja por las células musculares para activar a la enzima guanilato ciclasa (GC), que cataliza la formación de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir de guanosina 5-trifosfato (GTP) (Centelles *et al.*, 2004). La reacción de desfosforilación de la cadena de miosina lleva a la relajación del vaso sanguíneo. Como consecuencia de la activación del cGMP, se lleva a una disminución de los niveles de calcio intracelular y un aumento de la permeabilidad para el potasio, originando hiperpolarización (Yamamoto *et al.*, 1999).

El NO, por otra parte, también difunde hacia la luz del vaso donde inhibe la adhesión y agregación plaquetaria usando también la vía del cGMP. En las mismas células el exceso de cGMP es transformado en GMP por la enzima cGMP fosfodiesterasa (Murad, 2006).

Las dos enzimas claves en la homeostasis del cGMP son la GC, responsable de su síntesis y la fosfodiesterasa que lo degrada a 5'cGMP. En los últimos años se ha despertado un gran interés por la vía de señalización del cGMP, gracias al uso de sildenafil (viagra) inhibidor de una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos en el tratamiento de la disfunción eréctil (Centelles *et al.*, 2004).

Endotelina-1

La endotelina-1 (ET-1) es un péptido vasoconstrictor de 21 aminoácidos producido por el endotelio vascular (Schiffrin *et al.*, 1997). Se forma por el procesamiento de la preproendotelina-1 a proendotelina (Figura 4). La formación y liberación de la ET-1 estimulada por la AII, hormona antidiurética, citocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que actúan en el endotelio vascular (Ergul, 2002).

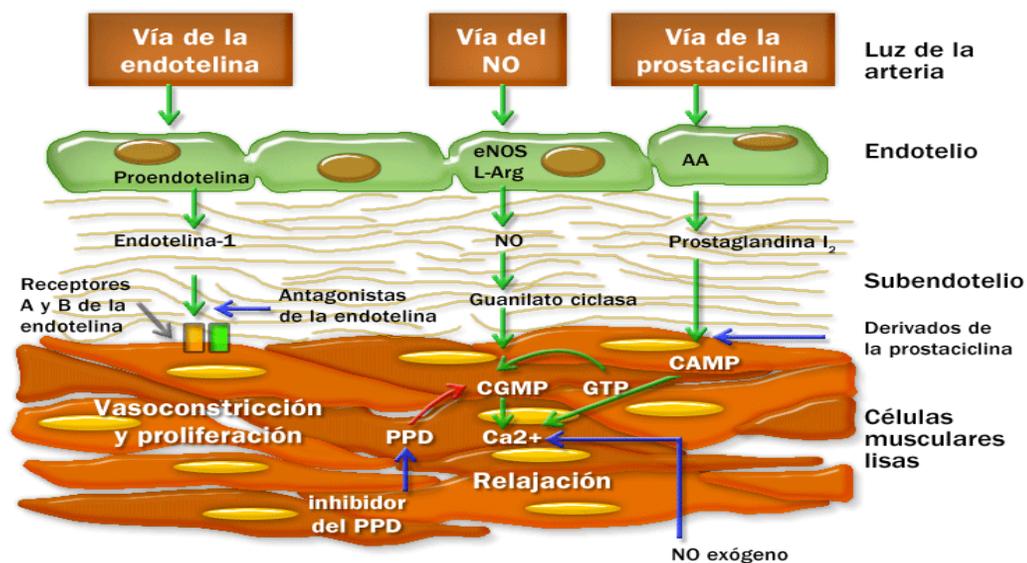


Figura 4. Vías que intervienen en la vasodilatación y vasoconstricción vascular. Vías que producen vasodilatación y antiproliferación (flechas verdes). Vía de la ET-1 produce vasoconstricción y proliferación (flechas rojas). Agentes terapéuticos que actúan sobre las moléculas específicas (flechas azules). FDE: fosfodiesterasa; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; cGMP: monofosfato de guanosina cíclico; GTP: guanosina 5-trifosfato; AA: ácido araquidónico; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial (Ferreira, 2006).

Una vez que la ET-1 es liberada por las CE, se une a sus receptores. Hay dos receptores, el ET_A y el ET_B. El receptor ET_A se ubica en el músculo liso y es un potente mediador de la vasoconstricción. El receptor ET_B se localiza en las CE y estimula la producción de NO (Kuboki, 2000).

La ET-1 tiene un papel complejo en la aterosclerosis, en la insuficiencia cardíaca y en el infarto agudo de miocardio (IAM). Estimula la agregación plaquetaria y la expresión de moléculas de adhesión. Participa en la inflamación estimulando la liberación de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el factor nuclear de transcripción de la cadena kappa B (NF-kB) (Stauffer *et al.*, 2008).

1.2 Disfunción endotelial relacionada a la obesidad

Se denomina “disfunción endotelial” al desequilibrio de los agentes vasodilatadores y vasoconstrictores, este desequilibrio es la causa de una gran variedad de enfermedades: como aterosclerosis, hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, IAM y diabetes mellitus, todas ellas vinculadas a la obesidad y con un alto riesgo de morbi-mortalidad (Acosta *et al.*, 2006).

La disfunción endotelial se caracteriza por: 1) alteración de la regulación del tono vasomotor con predominio del tono vasoconstrictor, debido al desequilibrio entre factores relajantes; 2) crecimiento de la pared vascular debido a un aumento del número y tamaño de las células musculares lisas y/o fibroblastos; 3) incremento en la permeabilidad del endotelio, con pérdida de la función de barrera selectiva para partículas y macromoléculas; 4) adhesión de leucocitos debido a la sobreexpresión de moléculas quimiotácticas y de adhesión, junto con una respuesta elevada a las citocinas; 5) agregación y adhesión plaquetaria a las CE y 6) fibrinólisis ineficaz, que lleva a riesgo trombótico (Figura 5) (Haynes *et al.*, 1998).

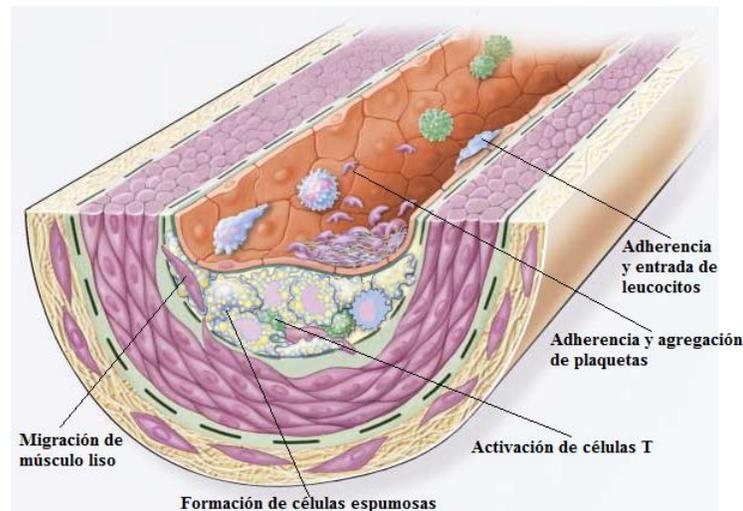


Figura 5. La disfunción endotelial como paso inicial evolutivo de la aterosclerosis Los cambios más tempranos que preceden a la formación de lesiones de aterosclerosis tiene lugar en el endotelio. Estos cambios incluyen el aumento de la permeabilidad endotelial a las lipoproteínas y otros componentes del plasma, que están mediados por el óxido nítrico. La estría grasa consiste en la formación de células espumosas, la migración de las células de músculo liso, la activación de las células T y la adhesión-agregación de plaquetas (Ross, 1999).

La hipercolesterolemia como un factor de riesgo de la aterosclerosis coronaria. Las células espumosas al igual que las células musculares lisas acumulan lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) que atraviesan la barrera endotelial y son oxidadas por radicales libres producidos por las CE. Las LDL_{ox} inician la activación de los macrófagos, que forman células espumosas como rasgo característico de la formación de placas ateroscleróticas. Las lesiones se desarrollan en la túnica media y consisten en una gruesa capa de tejido conjuntivo fibroso en la que están dispersos macrófagos, células musculares lisas, células espumosas, linfocitos y cristales de colesterol, donde la lesión se caracteriza por acumulación de lípidos (Figura 6) (Ross, 2008).

En la actualidad se sabe que la asociación entre obesidad, enfermedad metabólica y cardiovascular depende del buen o mal funcionamiento del endotelio vascular (Malnick *et al.*, 2006). Además en la obesidad se presenta un proceso inflamatorio que estimula la producción de citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda y factores angiogénicos, que inducen la enfermedad cardiovascular (De Ferranti *et al.*, 2008).

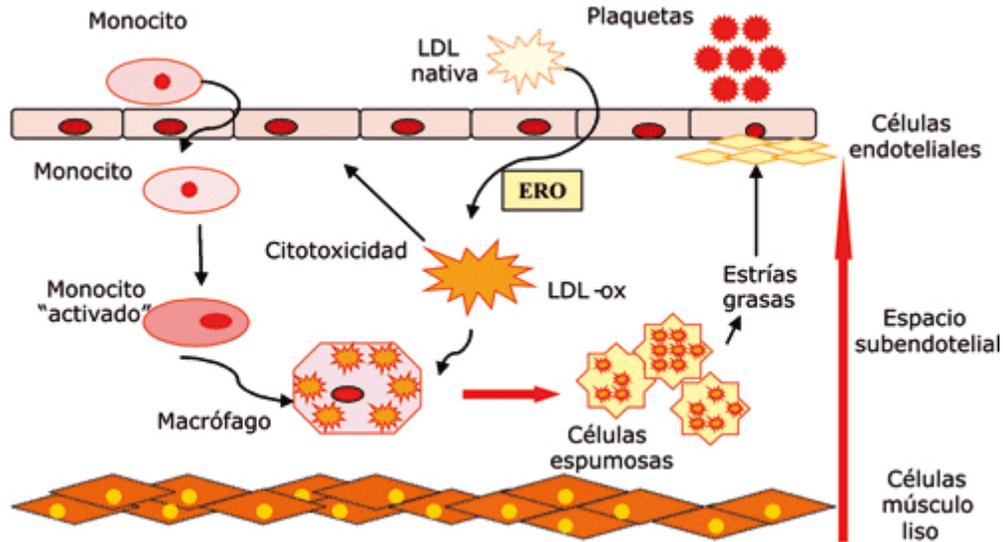


Figura 6. Eventos iniciales en la formación de la estría grasa. Los monocitos se adhieren al endotelio, que expresa moléculas de adhesión como consecuencia inflamatoria. Los monocitos adheridos migran y se diferencian a macrófagos. Al endocitar LDL oxidadas vía receptores *scavenger* se transforman en células espumosas (Delgado, 2009).

1.3. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano endocrino que está íntimamente comunicado con el cerebro y los tejidos periféricos a través de adipocinas (De Ferranti *et al.*, 2008). Existen dos tipos de tejido adiposo:

- ✓ El **tejido adiposo blanco (TAB)**, que es el encargado del almacenamiento de la grasa y la secreción de citocinas (Sánchez, 2005).
- ✓ El **tejido adiposo marrón (TAM)**, que es el encargado de la termogénesis tiene una gran cantidad de mitocondrias, las cuales expresan altas cantidades de proteínas desacoplantes con funciones de fosforilación oxidativa, lo que produce la disipación de energía en forma de calor (Brandan, 2008).

La unidad funcional del tejido adiposo es el adipocito, que es una célula diferenciada y especializada, proveniente del adipoblasto. A nivel molecular, el proceso de la adipogénesis implica la activación de una cascada altamente coordinada y regulada por factores de transcripción que en conjunto, conducen al establecimiento del estado diferenciado. Un factor clave para el desarrollo normal de este proceso es el receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR- γ), un miembro de la superfamilia de los receptores

nucleares que regulan la expresión de la caveolina, una proteína importante para la fisiología del adipocito (Clavijo, 2007).

Entrada y almacenamiento de los ácidos grasos en el adipocito

Los triglicéridos originados en el proceso digestivo ingresan a la circulación en forma de quilomicrones y lipoproteínas, una vez ahí, los triglicéridos son sometidos a una hidrólisis progresiva hasta convertirlos en ácidos grasos libres y glicerol. Los ácidos grasos son captados por el adipocito, principalmente para ser reesterificados y almacenarse como triglicéridos, que serán utilizados como combustible celular durante el ayuno o el ejercicio, mientras que el glicerol es captado principalmente por las células hepáticas (Sánchez, 2006).

Se sabe que el adipocito, además de su tradicional función como depósito de energía, posee actividad de célula secretora, funcionando como un órgano endócrino produciendo y liberando hormonas, llamadas adipocinas (Figura 7) (Wozniak *et al.*, 2009).

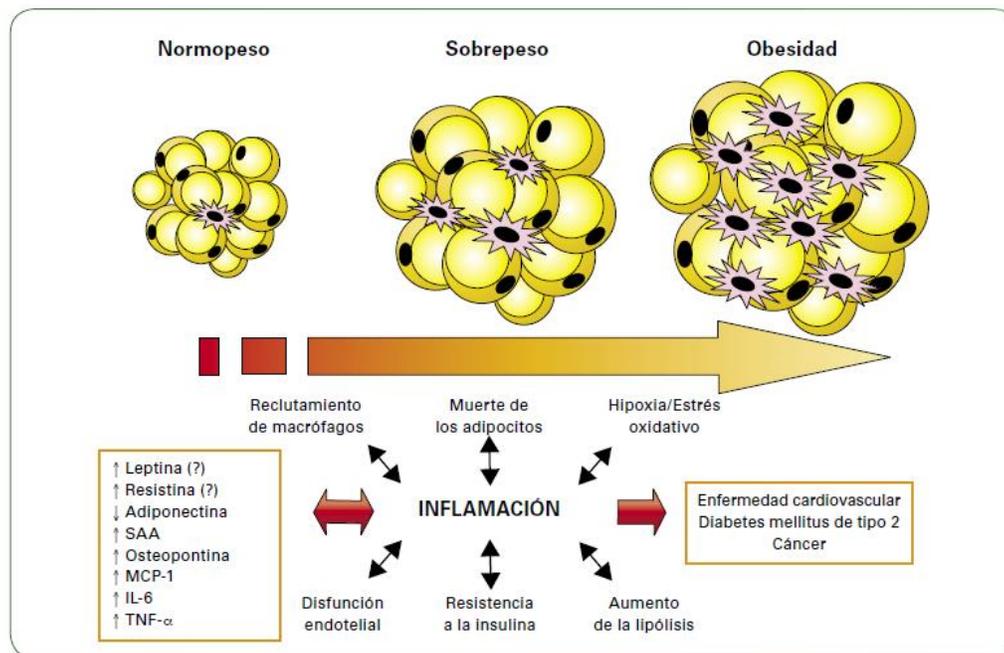


Figura 7. Relación entre la expansión del tejido adiposo y el incremento del estado proinflamatorio. A medida que aumenta el tejido adiposo, se modifica la producción de adipocinas y se desencadenan una serie de procesos fisiopatológicos relacionados con la inflamación que van a conducir a un incremento del riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus de tipo 2 y cáncer, entre otras enfermedades. IL-6: interleucina 6; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; SAA: factor sérico amiloide A; TNF-α (Gómez, 2008).

Adipocinas

Las adipocinas o “adipocitocinas” son moléculas bioactivas provenientes principalmente del TAB que tienen un papel importante en la homeostasis de algunos procesos fisiológicos, entre los que se incluyen:

- Regulación del peso corporal (leptina, CRP30/adipoQ) (Brandan, 2008).
- Función vascular (angiotensina e inhibidor del plasminógeno tipo 1) (Brandan, 2008).
- Función reproductiva (Brandan, 2008).
- Desarrollo de resistencia a la insulina (resistina) (Brandan, 2008).
- Regulación del equilibrio energético, de la acción de la insulina y del metabolismo de la glucosa (ejemplo: proteína estimuladora de acilación) (Sánchez, 2005).
- Regulación de la presión arterial y la coagulación (ejemplos: angiotensinógeno y PAI-1) (Sánchez, 2005).
- Función del sistema inmune (TNF- α , IL-1, IL-6) (Brandan, 2008).

En la década de los 90 se identificó a la leptina, una adipocina relacionada con la obesidad y la disfunción endotelial (Halaas, 1995). Con esto se inició la caracterización de una serie de factores secretados por el tejido adiposo (Wozniak *et al.*, 2009).

1.4. Leptina

Esta hormona es una proteína de 146 aminoácidos, conformada por cuatro hélices (Brandan, 2008). Tiene un peso molecular 16 kDa, y fue descubierta en el contexto de sus efectos sobre el control de la alimentación y del gasto energético (Figura 8) (Zhang *et al.*, 1994). La palabra leptina, del griego “*leptos*” delgado, hace referencia a su efecto protector contra la obesidad. En 1995, utilizando la técnica de “*Northern Blot*” se demostró que el adipocito sintetiza la leptina (Green *et al.*, 1995). Se define como una citocina con acciones pleiotrópicas, ya que actúa en la regulación del peso corporal, la reproducción, el crecimiento, la respuesta inmune, la inflamación, el tono vascular y estimula la angiogénesis (Fernández *et al.*, 2010).

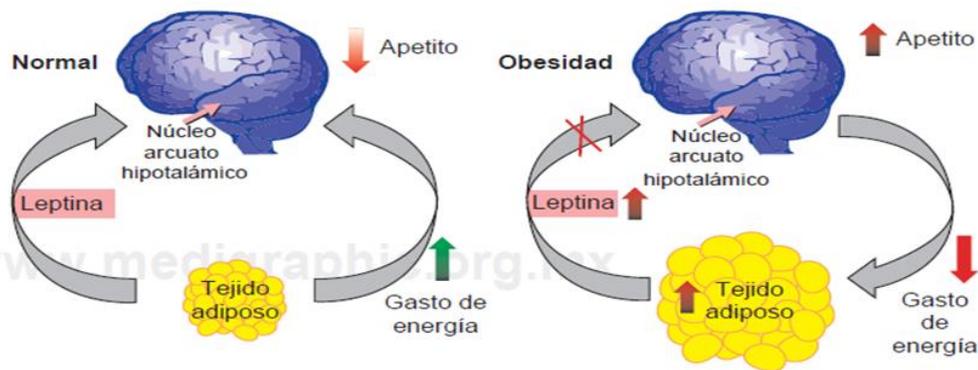


Figura 8. La leptina producida en el adipocito regula el apetito a nivel cerebral y estimula el gasto energético. A la derecha de la figura se muestra la diferencia cuando existe exceso de tejido adiposo (Manuel *et al.*, 2012).

Síntesis y secreción de la leptina. Es producida principalmente por el tejido adiposo, aunque también se produce en la placenta, ovarios, músculo esquelético y en las CE. Su secreción está regulada por diversas hormonas; entre quienes aumentan su producción se encuentran los glucocorticoides, la insulina, la interleucina-1 y el TNF- α ; mientras que las hormonas tiroideas atenúan su expresión (Brandan, 2008).

Receptores de leptina. Se denominan OB-R y pertenecen a la familia de los receptores de citocinas. Los receptores de leptina localizados en el hipotálamo, se encuentran codificados por el gen *db* y fueron identificados cuando se construía la biblioteca de cDNA murino. Estos receptores tienen un dominio extracelular, constituidos por repeticiones de cuatro residuos de cisteína (Heim, 1996). La unión de la leptina al receptor induce la dimerización del receptor (Brandan, 2008).

Tipos de receptores de leptina

- El receptor de la leptina forma larga (OB-Rb), inicialmente se consideraba que era el único funcional. Predomina en el hipotálamo, en donde actúa como inductor de la saciedad (Ghilardi *et al.*, 1996). Sus funciones consisten en mediar las acciones de la leptina a nivel del sistema nervioso central. La ausencia o el mal funcionamiento de este receptor es lo que provoca el fenotipo de obesidad en modelos animales (Uotani *et al.*, 1999).

- Las formas cortas (OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd y OB-Rf) se localizan en el hipotálamo, riñones, pulmones, tejido adiposo, hígado, páncreas, endotelio y corazón. Sus funciones se han relacionado con el transporte, degradación de la leptina y regulación del sistema inmune. Son capaces de activar cascadas de señalización (Uotani *et al.*, 1999).
- El receptor más pequeño es el OB-Re y carece de dominio intracelular. Parece probable que este receptor, al poseer una forma soluble, esté relacionado con el transporte de la leptina en plasma y a través de la barrera hematoencefálica. Los receptores de leptina cortos y largos son idénticos hasta el residuo de lisina (Figura 9) (Bernotiene *et al.*, 2006).

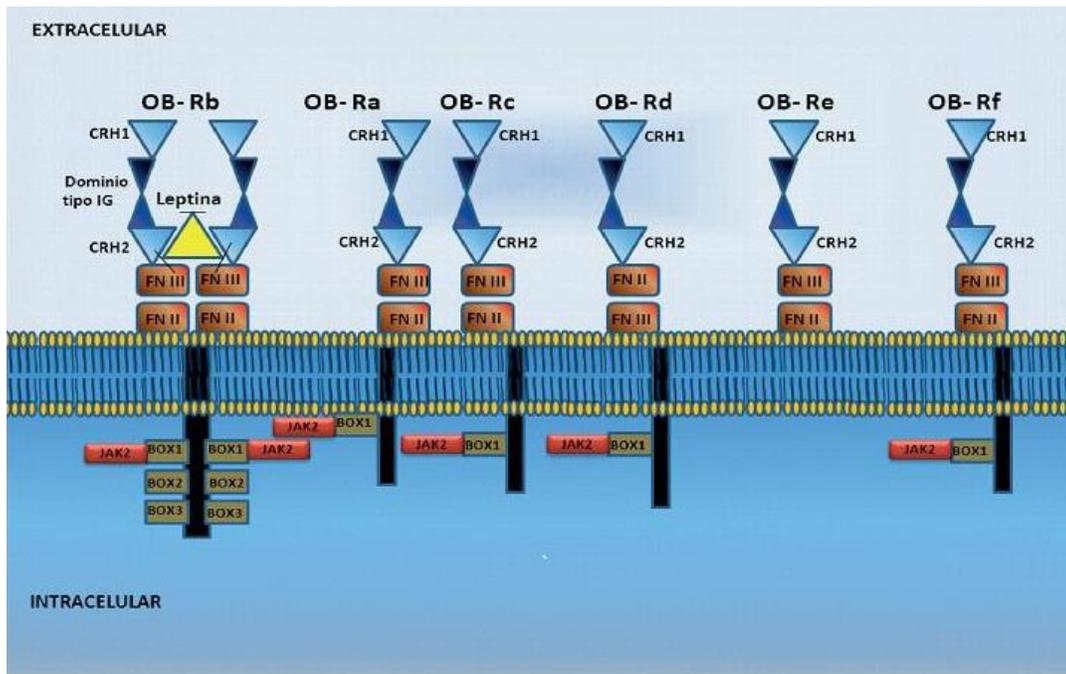


Figura 9. Isoformas del receptor de la leptina. El dominio extracelular está compuesto por dos dominios de unión a citocinas (CRH1 y CRH2), un dominio de fibronectina II (FN II), un dominio de fibronectina III (FN III) y un dominio de unión a inmunoglobulina (isoforma-b). En el dominio intracelular, la isoforma que contiene tres cajas (BOX1, BOX2, BOX3) puede desencadenar fosforilación de las moléculas STAT para continuar la vía de señalización (Echeverry *et al.*, 2012).

Mecanismo de Acción: La activación del receptor OB-Rb produce la transducción de señal a través de la vía Janus cinasa (JAK)/y el activador de la vía de la transcripción (STAT), con activación del factor de transcripción nuclear c-fos. La leptina también aumenta la actividad del fosfatidil inositol 3 cinasa (PI-3K) desencadenando señales que son importantes en la

modulación de sus efectos sobre la insulina. Se ha propuesto que también activa la vía de la Proteína cinasa A de forma directa (Brandan, 2008).

Señalización: receptor de leptina

La leptina, al unirse a su receptor OB-R en la membrana celular, induce la fosforilación de la proteína STAT-3, penetra al núcleo y regula la actividad transcripcional de los genes bajo el control de esta adipocina. La leptina disminuye la actividad de los factores de transcripción lipogénicos, principalmente PPAR- γ 2 y en el hepatocito la proteína transportadora del elemento regulador de esteroides (SREBP-1c). De esta manera, induce una disminución en la expresión de las enzimas lipogénicas acetil CoA carboxilasa (ACC) y sintetasa de ácidos grasos (FAS), incrementando la expresión de enzimas clave en la oxidación de los ácidos grasos como la acetil CoA oxidasa (ACO) y la carnitín-palmitoil transferasa (CPT-1), especialmente en el adipocito (Bastarrachea *et al.*, 2005).

Una vez que se ha dado la unión de la hormona al receptor, éste sufre un cambio conformacional por transfosforilación que activa a JAK, generando la fosforilación de residuos de tirosina en la región citoplasmática del receptor de leptina. La fosforilación en la tirosina 1138 del receptor es seguida por una asociación de las proteínas STAT3, las cuales también se fosforilan y causan la disociación del receptor y se translocan al núcleo para regular la expresión génica (Echeverry *et al.*, 2012).

Las proteínas STAT5 fosforiladas desencadenan una vía de señalización hacia la mitocondria relacionada con la apoptosis celular. La activación y señalización de la molécula STAT1, vía JAK2, aún no se ha clarificado completamente, pero se sugiere que por esta vía la leptina puede inducir una respuesta a las citocinas (Echeverry *et al.*, 2012).

La leptina induce una fuerte activación de STAT1 en ausencia de STAT3, lo que sugiere que STAT3 puede reprimir la activación de STAT1. Por su parte, las proteínas IRS pueden ser fosforiladas por varios sistemas de tirosin cinasa, ya sea relacionados con las isoformas larga o corta, y por esta vía activar la PI-3K que a su vez puede desencadenar otras vías de

señalización intrínseca a través de proteínas AKT (actividad de tirosin cinasa), relacionadas con la síntesis de glucógeno y el metabolismo de la glucosa (Figura 10). Esta última vía de señalización puede alterarse desencadenando un fenómeno conocido como resistencia a la leptina, modelo estudiado en roedores obesos en los cuales también se encontró resistencia a la insulina, por lo que una disfunción del receptor OB-R se relaciona con la diabetes (Echeverry *et al.*, 2012).

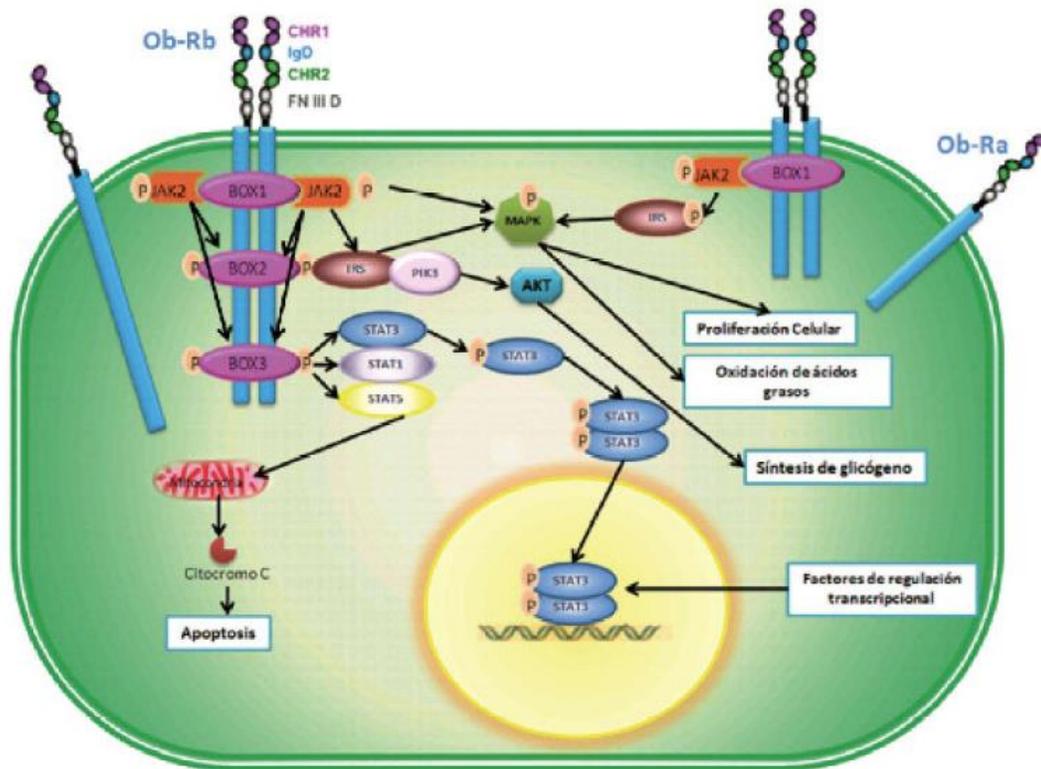


Figura 10. Vías de señalización del receptor de la leptina. En la imagen se ilustran las vías de señalización desencadenadas por la fosforilación de las moléculas JAK2 tanto por la isoforma larga como por la corta. La JAK2 activada puede fosforilar los residuos de tirosina del receptor y activar las moléculas STAT. El STAT3 participa como regulador transcripcional; el STAT5 puede activar la vía apoptótica y la activación de STAT1 aún no se ha dilucidado completamente. Por su parte, la molécula IRS puede activar proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y PI-3K para desencadenar vías de señalización relacionadas con proliferación celular, oxidación de ácidos grasos y metabolismo de la glucosa (Echeverry *et al.*, 2012).

Funciones de la leptina:

- Hormona liporreguladora al mantener una homeostasis lipídica intracelular normal. Interviene en la homeostasis energética (Bastarrachea *et al.*, 2005).
- A nivel hepático activa la enzima ACO y citrato sintetasa e inhibe a la ACC (disminuye la lipogénesis en el hígado y tejido graso, aumenta la oxidación, con lo que dirigen los ácidos grasos libres a su catabolismo por el ciclo de Krebs y disminuye su concentración intracelular) (Bastarrachea *et al.*, 2005).
- Sobre el metabolismo de los lípidos, estimula la lipólisis en el adipocito.
- Inhibe la secreción pancreática de insulina (Bastarrachea *et al.*, 2005).
- Aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y también la producción de citocinas proinflamatorias.
- Aumenta la proliferación de células hematopoyéticas.
- Promueve la angiogénesis y proliferación de CE.
- Mejora el flujo sanguíneo y facilita la disipación de calor y la oxidación lipídica (Brandan, 2008).
- En el estado de deficiencia de leptina, la activación disminuida del receptor en el hipotálamo causa una creciente producción del neuropéptido Y (NPY), el cual es orexigénico y por lo tanto responsable de la hiperfagia y cambios neuroendócrinos. Sin embargo, se han encontrado niveles aumentados de la leptina en la obesidad, considerando un estado de resistencia a leptina (Bastarrachea *et al.*, 2005).

La leptina y la disfunción endotelial

En condiciones de obesidad, la sobreproducción de leptina pierde la capacidad para inhibir el apetito y la sensibilidad a la insulina, estableciéndose un efecto denominado “Resistencia a la leptina” (Knudson, 2005). Cuando existe resistencia a la leptina, la cinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) no ejerce su inhibición sobre ACC, con lo que se sobreexpresa la enzima malonil CoA y se incrementa la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos (Figura 11), bloqueándose simultáneamente su oxidación al inhibir a la CPT-1 (Bastarrachea *et al.*, 2005).

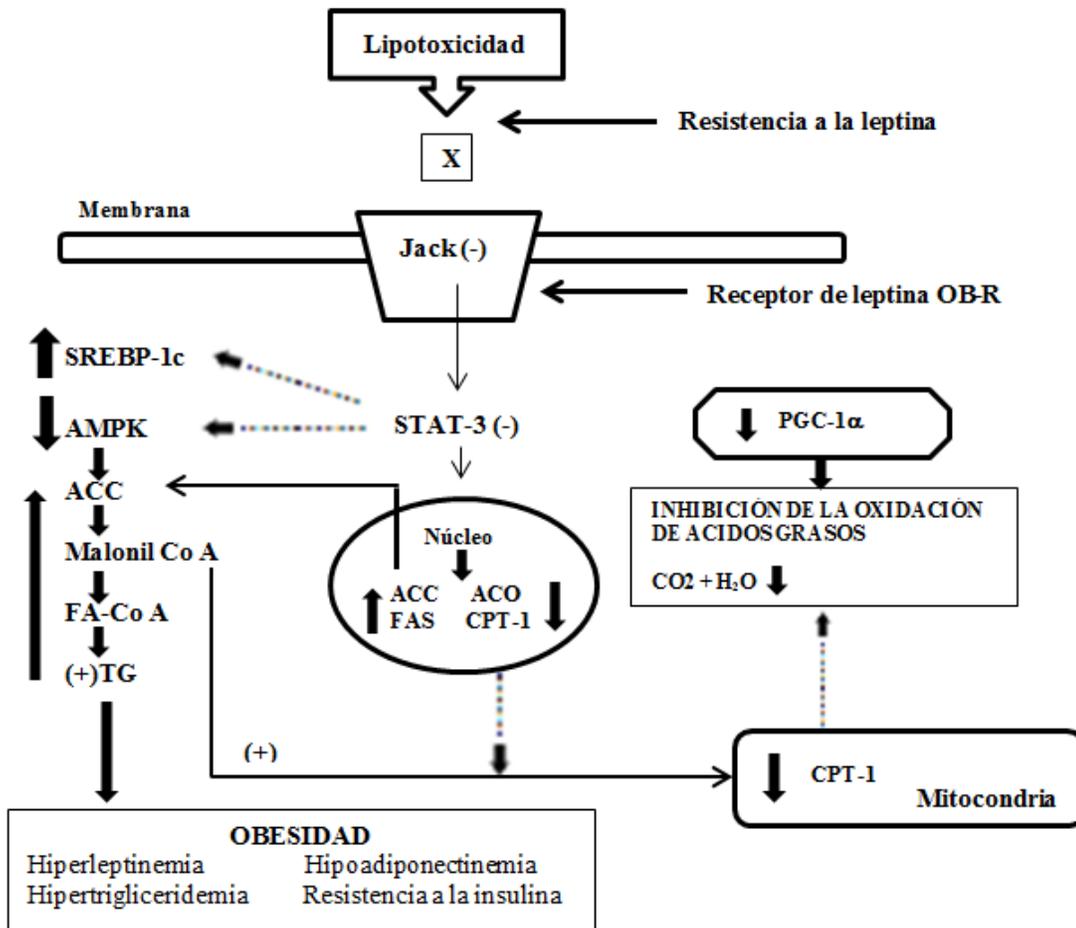


Figura 11. Fisiopatología molecular de la liporregulación. Resistencia a la leptina como factor central en el desarrollo de obesidad a través de precursores que dan lugar a generadores primarios como hiperleptinemia, hipoadiponectinemia, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina (Bastarrachea *et al.*, 2005).

La fisiopatología de la obesidad se caracteriza por un exceso de ácidos grasos circulantes, hiperleptinemia, hipoadiponectinemia, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, que son componentes claves en la angiogénesis (Bastarrachea *et al.*, 2005). Al existir una acumulación de lípidos, se encuentra una menor expresión de adiponectina, que es la adipocina antiinflamatoria. Además el aumento de citocinas inflamatorias como el TNF- α provoca que la adiponectina no pueda inhibir la expresión del factor proinflamatorio NF- κ B, y la producción de moléculas ICAM-1 y VCAM-1, generando la formación de células espumosas y la disfunción endotelial (Kougiaris *et al.*, 2005).

1.5. Acción de los estrógenos en la función endotelial

Los estrógenos son hormonas sexuales de tipo femenino producidas principalmente en los ovarios y en las glándulas adrenales por la estimulación de la hormona liberadora de gonadotropinas (HLGn). La familia de los estrógenos está compuesta por el estradiol, la estrona y el estriol, su precursor común es el colesterol (Cracchiolo *et al.*, 2002).

Los estrógenos tienen un papel primordial en el desarrollo sexual y la reproducción, están implicados en un gran número de procesos fisiológicos en varios tejidos, incluido el sistema cardiovascular. La evidencia epidemiológica sugiere que los estrógenos protegen a las mujeres contra la cardiopatía coronaria antes de la menopausia y los experimentos de la prevención de estría grasa demuestran una acción ateroprotectora del estradiol, sin embargo hay estudios contradictorios sobre su función en el daño cardiovascular y cáncer mamario con la terapia hormonal (Arnal, 2010).

El endotelio representa un blanco principal para el estradiol y sus efectos mediados por los receptores de estrógenos (ERs): ER α y ER β . Ambos pertenecen a la familia de los receptores nucleares y tienen distintos papeles fisiológicos, se ha reportado que el ER α parece mediar la mayor parte de las acciones del estradiol en el endotelio (Campos *et al.*, 2005).

Mecanismo de acción de los estrógenos

El estrógeno ingresa a la célula blanco y se une a los ERs. Tras la unión, los receptores se dimerizan y se translocan al núcleo, donde se asocian con el coactivador del receptor de esteroides 1 (SRC-1) y la proteína de unión de respuesta en la transcripción (CBP) y forma parte del complejo de iniciación para la transcripción, lo que conduce a la formación de mRNA. El mRNA interactúa con los ribosomas para producir proteínas específicas que expresan el efecto del estradiol sobre la célula blanco. El estradiol también afecta directamente a los canales de iones y receptores acoplados a la proteínas, independiente del receptor de estrógeno (Figura 12) (McCarthy, 2008).

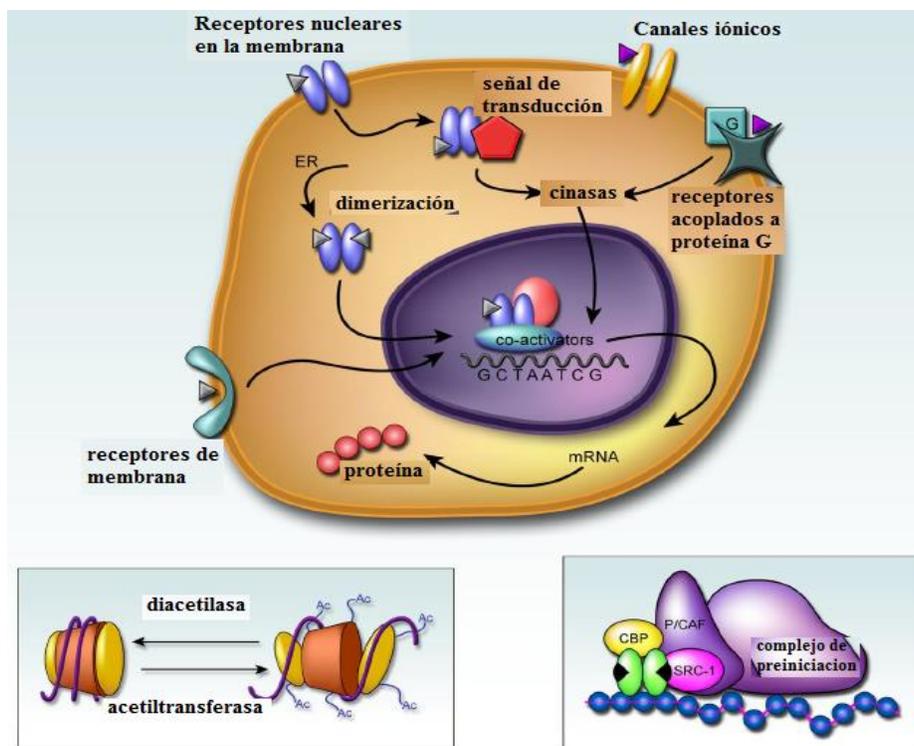


Figura 12. Mecanismo de acción de los receptores de estrógenos (McCarthy, 2008).

Efectos de los estrógenos en el endotelio

- ✓ Desempeñan un papel importante en la modulación de estímulos vasodilatadores, facilitan la síntesis, liberación y respuesta de FRDE (Darblade *et al.*, 2002).
- ✓ El estradiol incrementa la actividad del NO a través de la estimulación de la actividad de eNOS (Arnal, 2010).
- ✓ El efecto endotelial del estradiol podría representar un mecanismo clave de su efecto ateroprotector mediante la unión al ER α (Arnal, 2010).
- ✓ En un estudio *in vitro* en células RAW 264 7, tratadas con estradiol condujo a un efecto anti-inflamatorio, mediante la inhibición de NF-kB (Arnal, 2010).

Los efectos vasculares del estradiol a nivel celular y molecular están siendo investigados, ya que se requiere el entendimiento de sus efectos nocivos o benéficos. Hasta la fecha los resultados de los estudios de los efectos anti-inflamatorios de los estrógenos son controversiales (Sobrinho, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial la prevalencia de trastornos metabólicos como la obesidad, son la causa de eventos cardiovasculares que llevan a una disminución en la calidad de vida de quienes los padecen y ocasionan un gran impacto a nivel social y económico. Debido a que la incidencia de la obesidad va en aumento, es importante analizar los efectos de las moléculas derivadas del tejido adiposo, como las adipocinas (leptina, adiponectina) en el endotelio vascular e identificar los mecanismos que desencadenan los procesos inflamatorios que conducen a una disfunción endotelial con alteraciones en la función cardiovascular.

Por otra parte se ha descrito que los estrógenos tienen efectos sobre el control del tono vascular, sobre la proliferación y migración de células endoteliales. Por lo que el propósito del presente trabajo fue estudiar la participación de los estrógenos sobre la producción de óxido nítrico endotelial en ratas obesas, a fin de esclarecer posibles mecanismos protectores en la disfunción endotelial en ratas obesas.

3. HIPÓTESIS

Si la función endotelial se pierde durante la obesidad, entonces la exposición de células endoteliales de ratas obesas a estradiol debe revertir los efectos de la disfunción endotelial.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar el efecto del estradiol sobre la expresión de moléculas de inflamación y receptores de adipocinas en cultivo endotelial de aorta de rata obesa, y evaluar su asociación con la producción de óxido nítrico como posible mediador de la respuesta inflamatoria.

4.2. Objetivos específicos

- ✓ Generar un modelo experimental de obesidad en ratas Wistar, mediante una dieta hipercalórica (rica en grasas) a partir del día 21 hasta los 18 meses de edad, para inducir disfunción endotelial.

- ✓ Obtener un cultivo primario de células endoteliales de aorta torácica de ratas obesas y en el 4º pase activarlas con leptina e incubarlas en presencia de estradiol.

- ✓ Determinar la concentración de óxido nítrico en el sobrenadante del cultivo de células endoteliales de ratas obesas incubadas con estradiol.

- ✓ Determinar por *Western blot* la expresión de COX-2, ICAM-1, del receptor de leptina OB-Rb y de los receptores de adiponectina (Adipo R1 y Adipo R2) en células endoteliales incubadas con estradiol.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Modelo experimental

Ratas Wistar de 21 días de edad se dividieron en grupo control (C) (hembras n=10 y machos n=10) y grupo obeso (OB) (hembras n=10 y machos n=10). Ambos grupos fueron alimentados *ad libitum* con alimento para ratas (Purina 5012, PMI Nutrition, EE.UU) durante el tiempo del estudio (hasta los 18 meses de edad). El alimento del grupo OB se mezcló con grasa de cerdo (concentración final 25 %).

5.2. Cultivo primario de células endoteliales de aorta de rata

Para la obtención del endotelio de la aorta de ratas éstas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 60 mg/kg. y en condiciones estériles se extrajeron los segmentos torácicos de las aortas, los cuales fueron colocados en un tubo tipo Falcon de 15 mL que contenía 2 mL de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), adicionado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina (0.5 UI/mL), estreptomycin (0.5 µg/mL) y anfotericina B (1.25 µg/mL) (Gibco, CA, EE.UU).

Habiendo obtenido estos segmentos, dentro de la campana de flujo laminar se colocaron en un recipiente estéril dentro de la campana de flujo laminar donde se procedió a limpiarlos de sangre, grasa y tejido conectivo. Se realizó un corte longitudinal para poder exponer el lumen de la aorta que es donde se encuentra el endotelio y se introdujo a un tubo Falcon de 15 mL, que contenía 2 ml de DMEM al 5 % con colagenasa tipo IV (Sigma, St. Louis, EE.UU) de 125 CDU/mg (CDU= unidades de colagenasa digerida) en una concentración de 0.5 mg/ml de DMEM y se incubó durante 15 min a 37 °C (Gryglewsky *et al.*, 1997). Al término de éste proceso se eliminó el DMEM que contenía la enzima por decantación y se pasó el segmento de aorta a una caja de Petri que contenía DMEM al 10 % y por fricción con ayuda de un gendarme se desprendieron las CE de la cara luminal de la aorta. Las células fueron recolectadas en un tubo Falcon que contenía 2 mL de DMEM con 10 % de SFB y antibióticos y se centrifugaron 2 veces a 2000 rpm (diámetro de rotor 16.1 cm) durante 10 min a 4 °C. La suspensión celular fue transferida a un pozo de una placa de ELISA de 24 pozos para cultivo celular y se incubó a 37 °C, con una presión de saturación CO₂ al 5 %, hasta que alcanzaron el

95 % de confluencia celular. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 72 horas para mantener a las células en condiciones óptimas (Jaffe *et al.*, 1973).

Técnica de expansión celular

Para realizar la expansión celular se realizó aspirando el medio de cultivo y lavando con solución de *Hank's* (Gibco, California EE.UU) que también se extrajo por aspiración, se adicionaron 0.5 mL de tripsina 0.25 %, e incubó a 37°C durante 5 min. En seguida se adicionaron 0.5 mL de DMEM con SFB 10 % para detener la reacción de tripsinización. El contenido se transfirió a un tubo Falcon y se centrifugó a las mismas condiciones antes mencionadas. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 0.5 mL DMEM enriquecido con 20 % de SFB y antibióticos y se distribuyó en placas de cultivo de 24 pozos (Jaffe *et al.*, 1973).

Caracterización de las células endoteliales

En el fondo de una placa de 24 pozos se colocaron cubreobjetos redondos de 13 mm de diámetro por pozo y sobre estos se colocaron 1000 µL de la suspensión de CE (aproximadamente 100,000 células) (Corning, Cultek, Madrid, España) y se agregó 1 mL de DMEM adicionado con 5 % de SFB y antibióticos. Una vez alcanzado el 75 % de confluencia se aspiró el sobrenadante y se lavaron 3 veces con PBS agitando suavemente durante 5 min, en seguida se incubaron con paraformaldehído al 1% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M (PBS) pH 7.4 durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las CE se lavaron 3 veces con PBS agitando suavemente durante 5 min. Con el fin de permeabilizar la membrana celular, las células se lavaron 3 veces con Tritón X-100 al 0.1 % en PBS durante 5 min, agitando suavemente, se lavaron 3 veces con PBS agitando suavemente durante 5 min, posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos adicionando 50 µL de albumina sérica bovina (BSA) libre de IgG a cada cubreobjeto, se incubaron durante 30 min a 4 °C. Se lavaron 3 veces con PBS agitando suavemente durante 5 min cada lavado y se adicionaron 50 µL del anticuerpo policlonal de cabra anti-vWF humano (Santa cruz Biotechnology, Inc; EE. UU) diluido 1/500 en PBS, por cubreobjeto, y se incubó durante 12 h en cámara húmeda a 4 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min con agitación suave. Posteriormente, se agregaron 50 µL de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con FITC (isotiocianato

de fluoresceína) (Santa cruz Biotechnology, Inc; EE. UU) diluido 1/500 en PBS, y se incubó durante 12 h a 4 °C, se retiró el anticuerpo secundario y se lavó tres veces con PBS. Una vez extraído el PBS se agregaron 50 µL de la solución de yoduro de propidio por 10 min. Se lavó con PBS y se dejaron secar al aire y finalmente se colocaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos y se visualizó la tinción en un microscopio con fluorescencia a 10X.

Activación de las células endoteliales con leptina y expuestas con estradiol

Cuando las CE tenían el 90 % de confluencia se adicionó la leptina (Sigma, St. Louis, EEUU) a una concentración de 10^{-8} M (en DMEM con 5 % de SFB más antibióticos), en presencia de estradiol (Sigma, St. Louis, EEUU) 10 nM o 100 nM y se incubaron durante 48 h. Las células fueron lavadas tres veces con solución salina fisiológica (SSF) 0.09 % por 10 min. Se adicionaron 0.3 mL de solución amortiguadora de lisis para células (RIPA) con inhibidores de proteasas (Sigma, St. Louis, EEUU) para los estudios de *Western blot*, y se almacenaron a -70 °C.

5.3. Determinación colorimétrica de óxido nítrico

El sobrenadante del cultivo de CE se utilizó para la detección colorimétrica del NO utilizando el kit de detección de Arbor (MI, EE.UU). El límite de detección del kit fue de 0.94 µM para nitritos y de 3 µM para nitratos. Con un coeficiente de variación inter e intra ensayo menor al 8 %.

5.4. Cuantificación de proteínas

La pastilla del cultivo celular fue resuspendida en 100 µL de RIPA y se realizó la cuantificación de proteínas mediante la técnica descrita por Bradford (1976). Se realizó una curva estándar de proteínas de acuerdo con la tabla 3, partiendo de una solución de BSA conteniendo 1 µg/µL.

Tabla 3. Curva estándar de proteínas

Volumen del estándar (1µg/µL)	H ₂ O destilada (µL)	Reactivo de Bradford (µL)	Volumen Final (µL)	Concentración µg/mL
0	800	200	1000	0
2	798	200	1000	2
4	796	200	1000	4
8	792	200	1000	8
12	788	200	1000	12
16	784	200	1000	16
20	780	200	1000	20

En el caso de las muestras problema se tomaron 5 µL, se completó a 800 µL con agua destilada y se adicionaron 200 µL de reactivo Bradford. Finalmente se midió la absorbancia de la curva estándar y muestras a 595 nm. Las concentraciones se determinaron a partir de la interpolación de los valores obtenidos en la regresión lineal de la curva de calibración.

Preparación de la muestra para *Western blot*

Las muestras se ajustaron para tener una concentración final de 50 µg de proteína en 20 µL. A esta muestra se adicionó el mismo volumen de Amortiguador de Laemli (Biorad, EE. UU) con β-mercaptoetanol y se incubaron a 95 °C durante 5 min, se conservó a -70 °C hasta el momento de su uso.

5.5. *Western blot*: Se realizó la separación de proteínas, colocando 25 µg de proteína/pozo, mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % durante 1 h a 100 Volts, utilizando una cámara Miniprotean 3 (Biorad, EE. UU). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) (Millipore Immobilon, EE. UU) en condiciones semihúmedas a 25 Volts durante 35 min. La membrana se bloqueó contra la unión inespecífica utilizando leche descremada al 5 % en TBS-Tween 20, durante 1h a temperatura ambiente.

La membrana se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de ratón anti β-actina (Santa cruz Biotechnology, Inc; EE. UU) (ver Tabla 4), diluido 1/300 en TBS-Tween 20.

Se lavó tres veces con TBS-Tween 20, agitando suavemente, durante 10 min. Después de lavar, la membrana se incubó con un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma, St. Louis, EEUU) diluido 1/3000 en TBS-Tween20 durante 1 h a TA. Se lavó como se indicó anteriormente. La membrana se reveló con el sustrato Luminata™ Crecendo (Millipore, EE. UU), para su revelado en una película radiográfica BioMax (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, EE. UU). Las radiografías se analizaron por densitometría (Gel Logic 100, Kodak), con el fin de cuantificar la cantidad de proteína.

El proceso anterior se repitió con anticuerpos primarios contra COX-2, ICAM-1, Adipo R1, Adipo R2 y OB-Rb (Santa Cruz Biotechnology, Inc; EE. UU).

Tabla 4. Proteínas y anticuerpos utilizadas en la técnica de *Western blot*.

Proteína Peso molecular (kDa)	Anticuerpo 1° (dilución) Santa cruz Biotechnology, Inc; EE. UU	Anticuerpo 2° conjugado a peroxidasa rábano (dilución) Sigma, St. Louis, EE.UU
B-actina (49)	Ac monoclonal de ratón 1/300	cabra anti- IgG de ratón 1/3000
COX-2 (70-72)	Ac monoclonal de ratón 1/200	cabra anti- IgG de ratón 1/3000
ICAM-1 (85-100)	Ac monoclonal de ratón 1/200	cabra anti- IgG de ratón 1/3000
OB-Rb (100-125)	Ac monoclonal de ratón 1/200	cabra anti- IgG de ratón 1/3000
Adipo R1 (42)	Ac polyclonal de conejo 1/200	burro anti- IgG de conejo 1/3000
Adipo R2 (44)	Ac polyclonal de conejo 1/200	burro anti- IgG de conejo 1/3000

5.6. Análisis estadístico

Los resultados experimentales para la comparación de peso corporal (C y OB) se analizaron por una comparación de medias tipo *t* de *Student*. Para evaluar la diferencia entre los grupos de estudio C y OB en los demás estudios se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba Tukey's, empleando GraphPad Prism versión 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego CA, EE.UU). En todos los casos se consideró una diferencia estadística significativa con una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Modelo experimental de obesidad

Al cumplir 18 meses de edad las ratas fueron pesadas y se observó que el grupo de hembras OB tenía un peso corporal promedio mayor al 15 % (368.5 ± 21 g) comparado con el grupo de hembras C (321 ± 14 g) ($p < 0.01$). En el caso de los machos OB el peso corporal promedio fue mayor a 20 % (609 ± 28 g) comparado con el grupo de machos C (498 ± 12 g) (Figura 13).

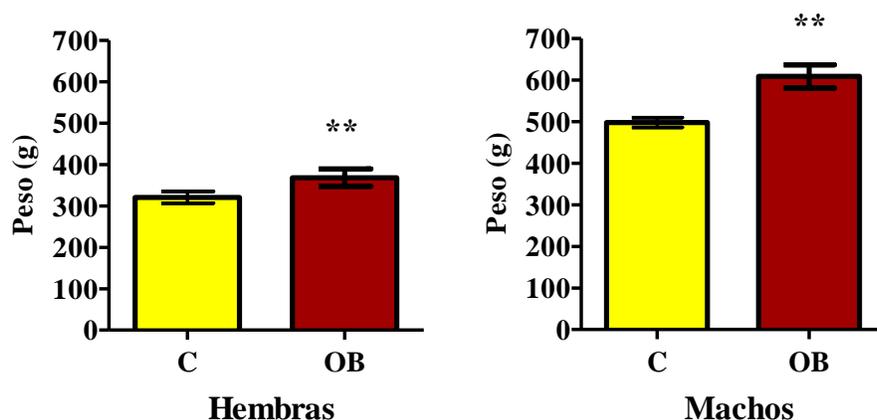


Figura 13. Peso corporal de ratas Wistar controles (C) y obesas (OB). Efecto de la dieta hipercalórica en el grupo OB (machos $n=10$ y hembras $n=10$) comparado con el grupo C (machos $n=10$ y hembras $n=10$). Los datos se presentan como el promedio \pm SD. La diferencia estadística fue de $**p < 0.01$ entre el C y el OB. Prueba t de Student.

Disección de ratas en los grupos experimentales

La Figura 14 muestra el aspecto macroscópico de la cavidad abdominal, puede observarse un aumento en el tejido adiposo blanco de la rata OB (14b) comparada con la rata C (14a).



Figura 14. Comparación en la acumulación de tejido adiposo en rata Wistar a) con dieta estándar b) con dieta hipercalórica.

6.2. Cultivo celular de endotelio

Los cultivos celulares obtenidos de la aorta torácica fueron analizados por microscopia mostraron formas poliédricas con marcadas interdigitaciones (Figura 15a).

La caracterización de CE se hizo mediante la identificación del vWF por la técnica citoquímica de inmunofluorescencia lo que confirmó la presencia de CE (Figura 15b).

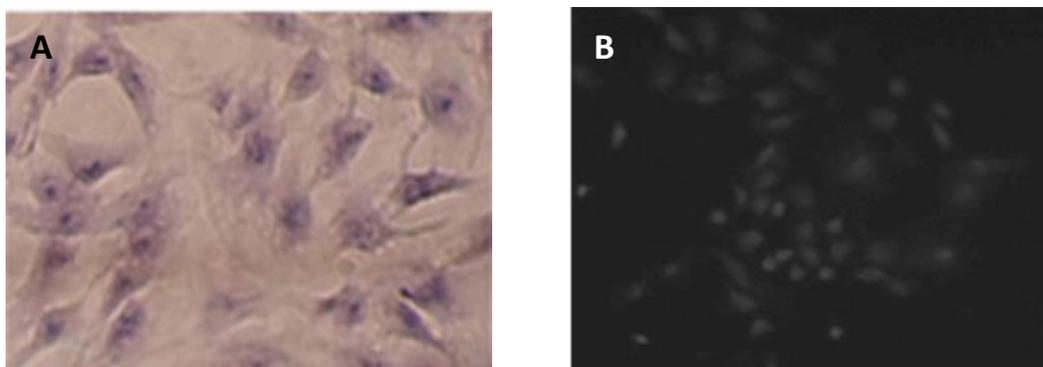


Figura 15. Microfotografías de cultivo de células endoteliales de aorta de rata.

- a) Se observan células con formas poliédricas con marcadas interdigitaciones
- b) Representación esquemática de la identificación del vWF en cultivo endotelial aórtico por citoquímica de inmunofluorescencia.

6.3. Cuantificación de óxido nítrico

La determinación colorimétrica de NO en el sobrenadante del cultivo endotelial aórtico mostró valores basales muy similares ($p=0.85$), en hembras C la producción fue de $33.4 \pm 1.9 \mu\text{M}$ y en machos C de $32.7 \pm 2.4 \mu\text{M}$.

En el sobrenadante de cultivo endotelial aórtico de hembras OB, el valor fue de $39.2 \pm 4.3 \mu\text{M}$, sin diferencia significativa con respecto al grupo C; en hembras OB con estradiol 10 nM el valor fue de $21.9 \pm 3.2 \mu\text{M}$, por lo cual presentó una disminución significativa ($p<0.001$) contra el grupo OB; para el grupo expuesto con estradiol 100 nM se obtuvo una concentración de $35 \pm 1.2 \mu\text{M}$, sin diferencia significativa contra el grupo OB, sin embargo mostró un aumento significativo ($p<0.01$) contra el grupo tratado con estradiol 10 nM (Figura 16).

En el sobrenadante de cultivo endotelial aórtico de machos OB, el valor fue de $38.6 \pm 0.66 \mu\text{M}$ sin diferencia significativa con respecto al grupo C, en machos OB con estradiol 10 nM el valor fue de $57.4 \pm 4.4 \mu\text{M}$, por lo cual presentó un aumento significativo ($p < 0.01$) contra el OB ($p < 0.05$); para el grupo expuesto con estradiol 100 nM se obtuvo una concentración de $31 \pm 3.2 \mu\text{M}$, sin diferencia significativa contra el grupo OB, sin embargo mostró una disminución significativa ($p < 0.01$) contra el grupo tratado con estradiol 10 nM ((Figura 16).

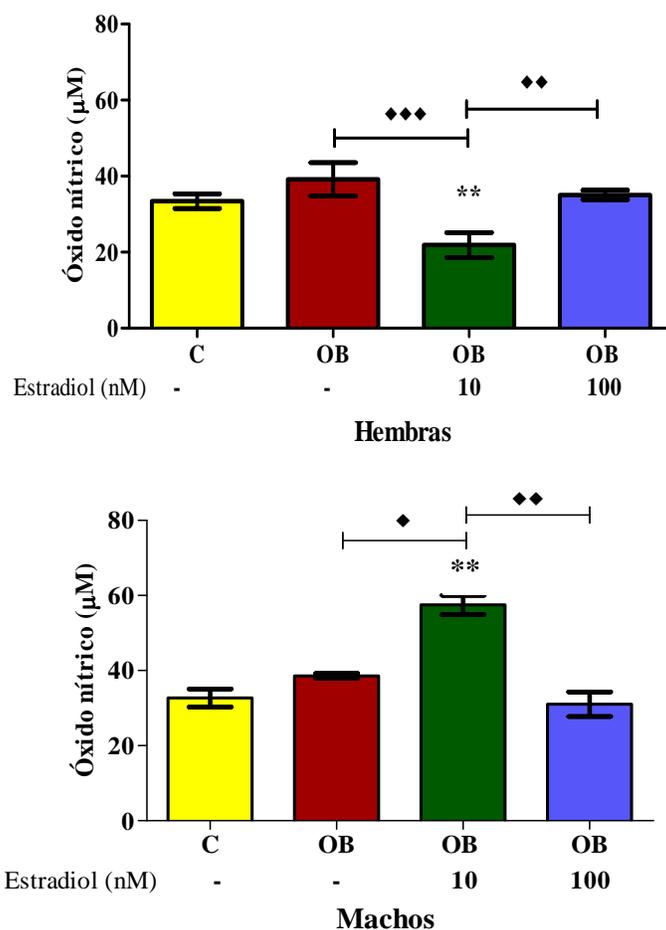


Figura 16. Determinación de óxido nítrico en sobrenadante de cultivo endotelial aórtico. C (control) y OB (obesos) tratados con estradiol (10 nM o 100 nM). Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos. La diferencia estadística fue de $**p < 0.01$ con respecto al grupo C. Entre los grupos OB $\blacklozenge p < 0.05$, $\blacklozenge\blacklozenge p < 0.01$ y $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge p < 0.001$. La comparación entre grupos fue empleando ANOVA y Tukey's.

6.4. Expresión de COX-2 mediante *Western blot*

La expresión relativa de COX-2 en CE de hembras OB fue de 0.20 ± 0.01 con una diferencia significativa ($p < 0.01$) con respecto al grupo C (0.008 ± 0.002). Sin embargo, el grupo expuesto con el estradiol de 100 nM mostró una expresión de 0.36 ± 0.02 , presentó un aumento significativo ($p < 0.01$) contra el grupo OB y el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.05$). La expresión relativa de COX-2 en CE de machos OB fue de 0.155 ± 0.030 sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.180 ± 0.002). Sin embargo en machos OB con estradiol 10 nM el valor fue de 0.279 ± 0.060 , presentó un aumento significativo ($p < 0.05$) contra el grupo OB. El grupo tratado con el estradiol de 100 nM mostró una expresión de 1.152 ± 0.060 , aumento significativo contra el grupo OB ($p < 0.001$) y el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.001$) (Figura 17).

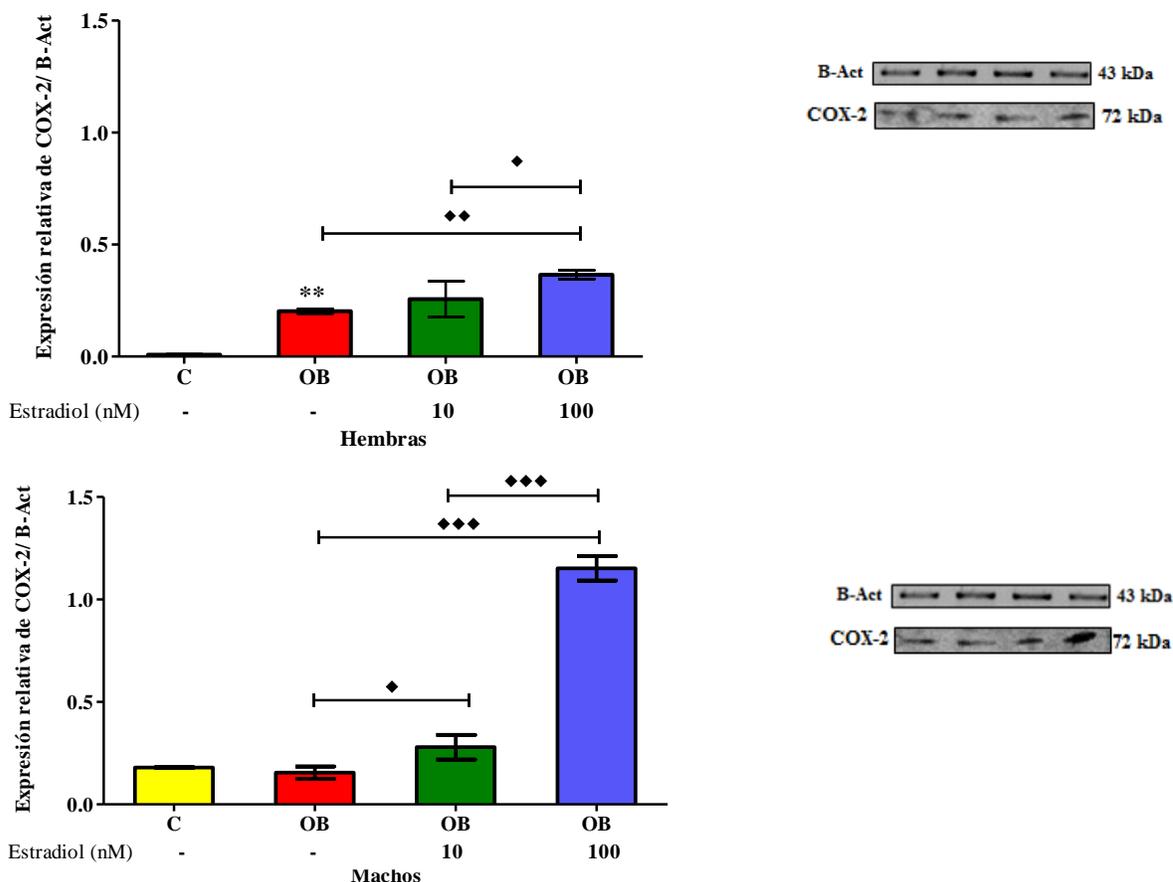


Figura 17. Expresión proteica de COX-2 en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar. C (control), OB (obesas) incubadas con estradiol 10 nM o 100 nM. Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos, La diferencia estadística fue de $**p < 0.01$ con respecto al grupo C Entre los grupos OB fue de $\diamond p < 0.05$, $\blacklozenge p < 0.01$ y $\blacklozenge\blacklozenge p < 0.001$. La comparación entre grupos fue empleando ANOVA y Tukey's. Las bandas presentan la expresión de COX-2 (72 kDa) /B- Actina (43kDa) mediante *Western blot*.

6.5. Expresión de ICAM-1 mediante *Western blot*

La expresión relativa de ICAM-1 en CE de hembras OB fue de 0.292 ± 0.03 con diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al grupo C (0.05 ± 0.01). Aunque el grupo tratado con el estradiol de 100 nM mostró una expresión de 1.154 ± 0.05 , presentando un incremento significativo ($p < 0.001$) contra el grupo OB y el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.001$).

La expresión relativa de ICAM-1 en CE de machos OB fue de 0.171 ± 0.03 con diferencia significativa ($p < 0.01$) con respecto al grupo C (0.05 ± 0.01). Aunque en machos OB con estradiol 10 nM el valor fue de 0.564 ± 0.04 , presentando un aumento significativo ($p < 0.001$) contra el grupo OB. Sin embargo, el grupo expuesto con el estradiol de 100 nM mostró una expresión de 1.327 ± 0.04 , presentó un incremento significativo contra el grupo OB ($p < 0.001$) y el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.001$) (Figura 18).

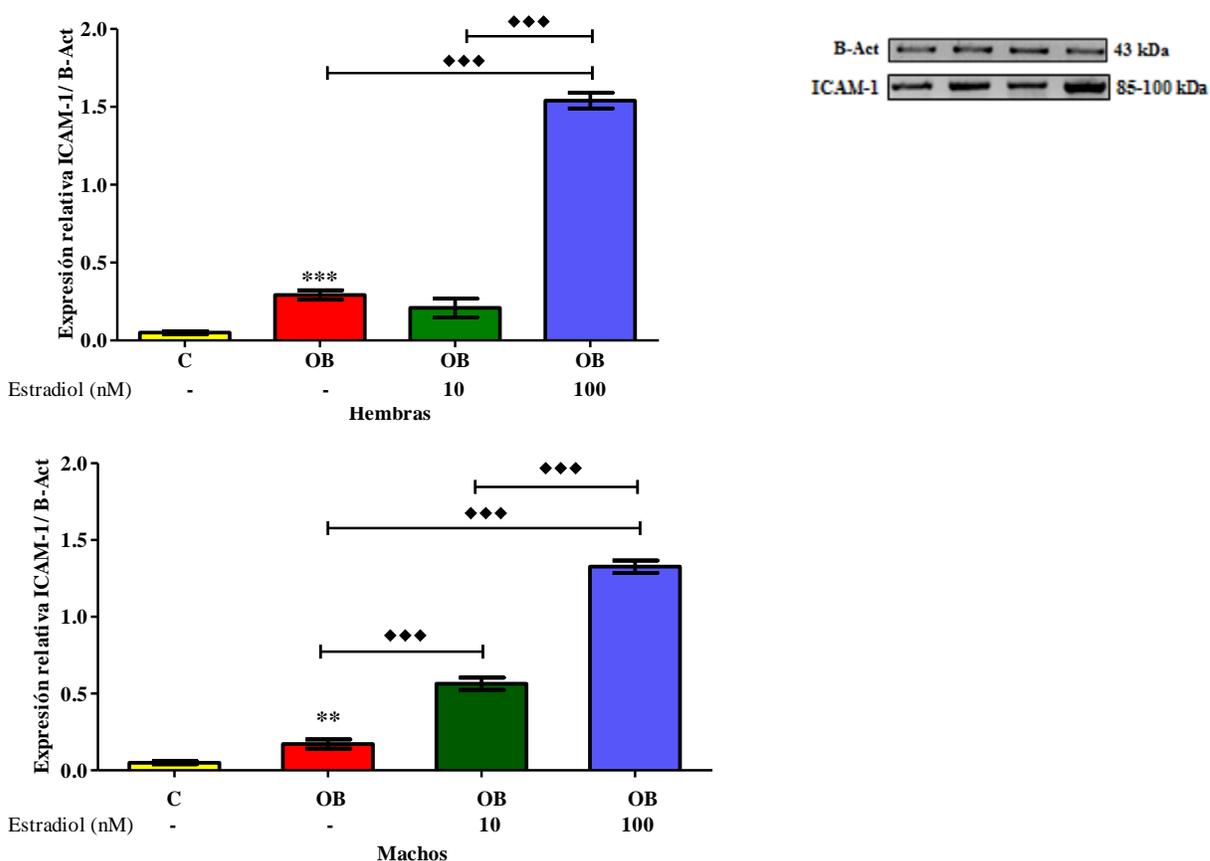


Figura 18. Expresión proteica de ICAM-1 en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar. C (control), OB (obesas) incubadas con estradiol 10 nM o 100 nM. Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos, La diferencia estadística fue de $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ con respecto al grupo C. Entre los grupos OB fue de $◆◆◆ p < 0.001$. La comparación entre grupos fue empleando ANOVA y Tukey's. Las bandas representan la expresión de ICAM-1 (85-100 kDa) /B-Actina (43 kDa) mediante *Western blot*.

6.6. Determinación de receptores de adiponectina en CE de hembras por *Western blot*

La expresión relativa de Adipo R1 en CE de hembras OB fue de 0.165 ± 0.03 sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.251 ± 0.01). Sin embargo, en hembras OB con estradiol 10 nM el valor fue 0.382 ± 0.06 , presentando un incremento significativo ($p < 0.001$) contra el grupo OB. El grupo incubado con el estradiol de 100 nM mostró una expresión de 0.414 ± 0.02 , con un aumento significativo ($p < 0.001$) contra el grupo OB. Para la expresión relativa de Adipo R2 en CE de hembras OB fue de 0.093 ± 0.1 ; sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.18 ± 0.02). Sin embargo, el grupo expuesto con estradiol 100 nM mostró una expresión de 0.414 ± 0.05 , con un aumento significativo contra el grupo OB ($p < 0.001$) y el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.001$) (Figura 19).

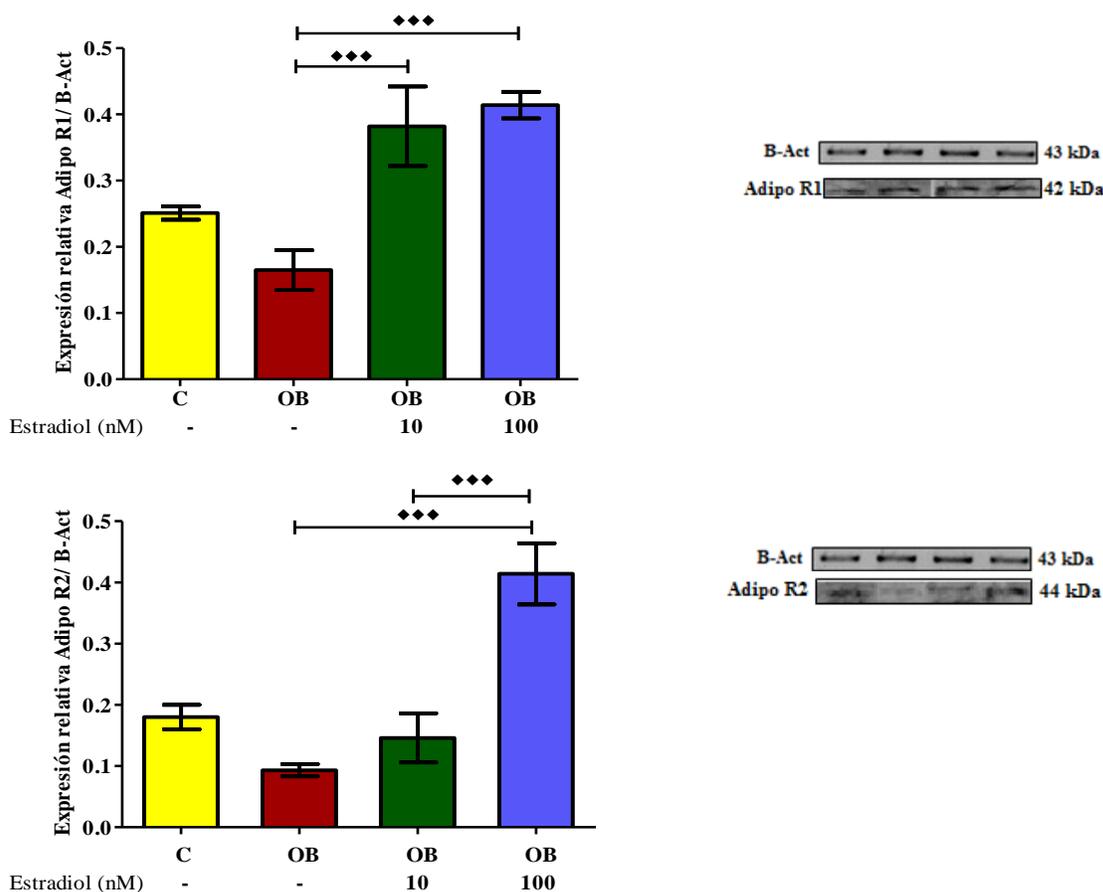


Figura 19. Expresión proteica de receptores de adiponectina en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar hembras. C (control) OB (obesas) incubadas con estradiol 10 nM o 100 nM. Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos. La diferencia estadística entre los grupos OB fue de $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0.001$. La comparación entre grupos fue empleando ANOVA y Tukey's. Las bandas representan la expresión de Adipo R1 (42 kDa) y Adipo R2 (44 kDa) /B- Actina (43 kDa) mediante *Western blot*.

6.7. Determinación de receptores de adiponectina en CE de machos por *Western blot*

La expresión relativa de Adipo R1 en CE de machos OB fue de 0.186 ± 0.04 sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.151 ± 0.01). Sin embargo en machos OB con estradiol de 100 nM mostró una expresión de 0.01 ± 0.002 , mostrando una disminución significativa contra el grupo OB ($p < 0.01$) y con el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.001$).

Para la expresión relativa de Adipo R2 en CE de machos OB fue de 0.143 ± 0.01 sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.18 ± 0.02). Sin embargo, en machos OB con estradiol de 100 nM mostró una expresión de 0.009, mostrando una disminución significativa contra el grupo OB ($p < 0.001$) y con el grupo OB con estradiol 10 nM ($p < 0.001$) (Figura 20).

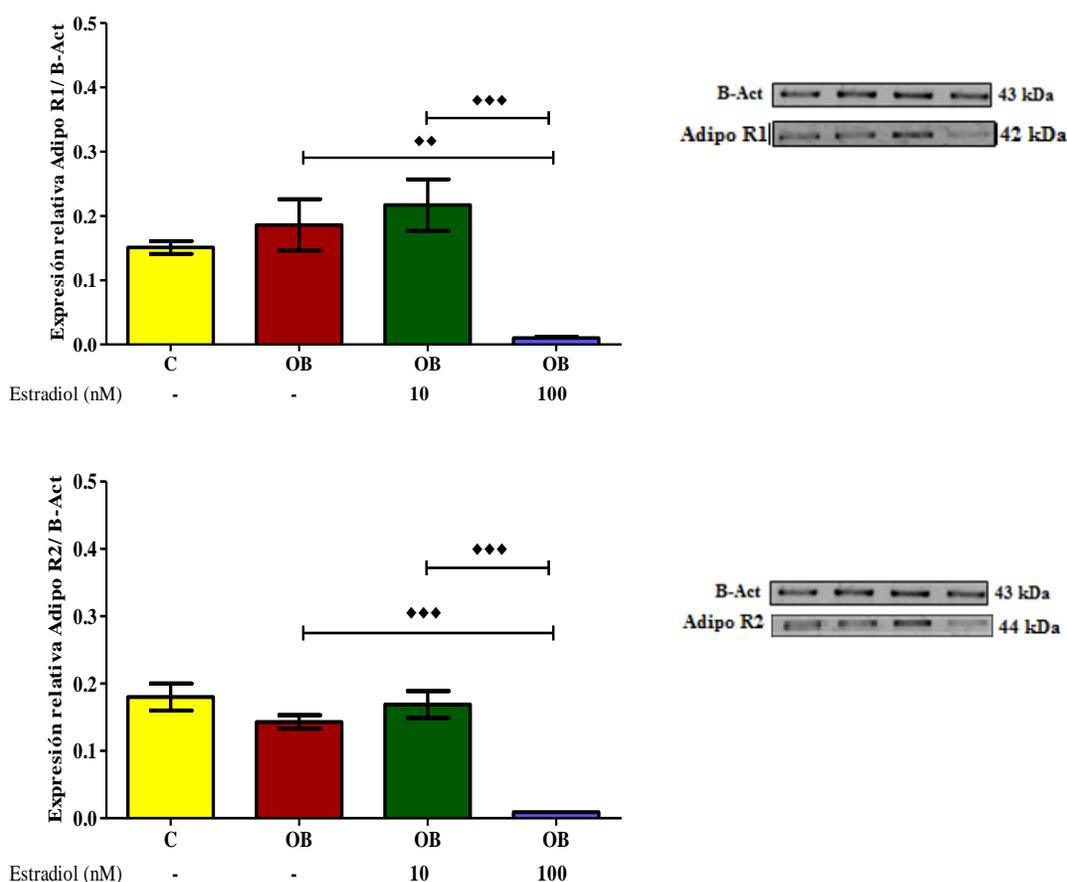


Figura 20. Expresión proteica de receptores de adiponectina en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar macho. C (control) OB (obesas) incubadas con estradiol 10 nM o 100 nM. Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos. La diferencia estadística entre los grupos OB fue de $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0.001$. La comparación entre grupos fue empleando ANOVA y Tukey's. Las bandas representan la expresión de Adipo R1 (42 kDa) y Adipo R2 (44 kDa) /B- Actina (43 kDa) mediante *Western blot*.

6.8. Determinación de la expresión del receptor OB-Rb de leptina en CE de rata

La expresión relativa del OB-Rb en CE de hembras OB, el valor fue de 0.034 ± 0.02 sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.024 ± 0.01); aunque en hembras OB con estradiol 10 nM el valor fue de 0.113 ± 0.01 , presentando un incremento significativo ($p < 0.001$) contra el grupo OB; para el grupo incubado con estradiol 100 nM se obtuvo un valor de 0.028 ± 0.01 mostrando una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto al grupo expuesto con estradiol 10 nM. La expresión relativa del OB-Rb en CE de machos OB, el valor fue de 0.028 ± 0.01 sin diferencia significativa con respecto al grupo C (0.023 ± 0.017); aunque en machos OB con estradiol 10 nM el valor fue de 0.194 ± 0.03 , presentando un incremento significativo ($p < 0.001$) contra el grupo OB; para el grupo incubado con estradiol 100 nM se obtuvo un valor de 0.04 mostrando una disminución significativa ($p < 0.001$) con respecto al grupo expuesto con estradiol 10 nM (Figura 21).

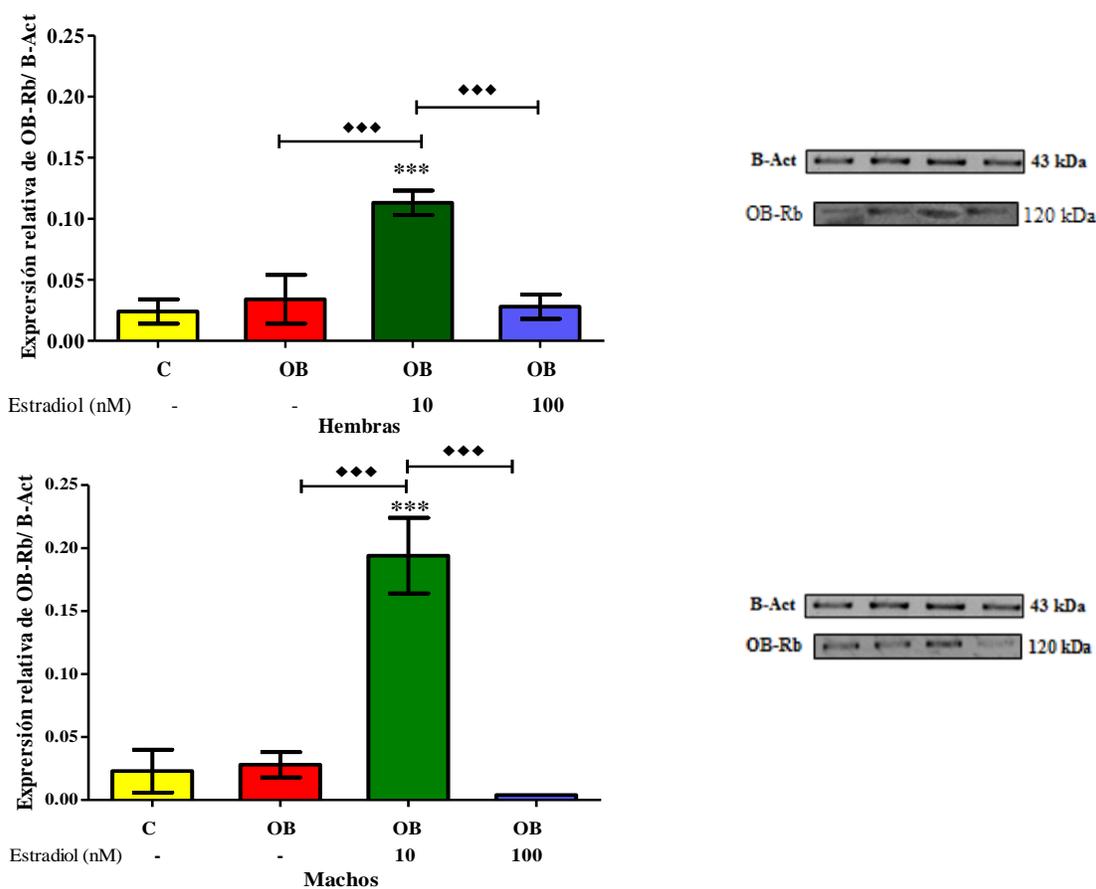


Figura 21. Expresión proteica del receptor OB-Rb de leptina en cultivo de CE de aorta de ratas Wistar. C (control) OB (obesas) incubadas con estradiol 10 nM o 100 nM. Los valores representan la media \pm SD de 3 experimentos. La diferencia estadística fue de *** $p < 0.001$ con respecto al grupo C. Entre los grupos OB fue de ♦♦♦ $p < 0.001$. La comparación entre grupos fue empleando ANOVA y Tukey's. Las bandas representan la expresión de OB-Rb (120 kDa) /B-Actina (43 kDa) mediante *Western blot*.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un estudio *in vivo* (mediante un modelo experimental de obesidad en animales) e *in vitro* (cultivo de CE tratadas con estradiol), con el fin de explorar la participación de los estrógenos en la reversión de daño endotelial inducido por leptina, mediante la medición de marcadores de inflamación como son el óxido nítrico, COX-2, ICAM, y los receptores de adiponectina y leptina.

Modelo experimental de obesidad

Se realizó un estudio con 20 ratas Wistar de 21 días de edad, divididas en 2 grupos (machos y hembras), que fueron sometidas a una dieta hipercalórica hasta los 18 meses de edad para la inducción experimental de obesidad. Al término del estudio machos y hembras tenían en promedio 20 % y 15 % (respectivamente) más peso que sus controles correspondientes, por lo que la dieta hiperlipídica empleada fue adecuada para lograr el modelo experimental de obesidad, esto se reafirmó al observar la cavidad abdominal de los animales disectados para obtener la aorta torácica, y está en concordancia con trabajos previos de este laboratorio (Manuel *et al.*, 2010; Manuel *et al.*, 2012).

Cultivo celular de endotelio

La obtención de la aorta torácica es muy delicada y debe ser realizada por personal capacitado en anatomía, manejo de condiciones de esterilidad, conocimientos de cultivos celulares, entre otros factores; que influyeron para tener el número de muestras adecuadas para los estudios *in vitro* que se realizaron posteriormente.

El cultivo de células endoteliales obtenido de la aorta torácica de rata Wistar visualizado por microscopia, corrobora su morfología elongada con un núcleo aplanado que en confluencia mostraron formas poliédricas con marcadas interdigitaciones; para confirmar que el cultivo pertenecía a CE se identificó un marcador típico del endotelio que es el vWF.

El uso de un cultivo de CE con estas propiedades nos permitió estudiar el mecanismo de modulación del estradiol sobre la producción de NO.

Cuantificación de óxido nítrico

Un factor clave, producido por el endotelio, es el NO el cual juega un papel importante en la homeostasis vascular, siendo este un vasodilatador arterial al cual se le atribuyen propiedades ateroprotectoras ya que disminuye el estrés oxidativo actuando así como un agente anti-inflamatorio en el sistema cardiovascular (Salas *et al.*, 2006).

Los estudios epidemiológicos en mujeres pre menopausicas, sugieren que los estrógenos tienen una función preventiva vascular, postulándose la interacción entre la vía del NO y los estrógenos como el mecanismo responsable (Jiménez *et al.*, 2001).

Estudios *in vitro* han reportado que los estrógenos potencian la vasodilatación dependiente del endotelio a través de la vía del NO, induciendo el aumento de la actividad de la eNOS y la liberación de NO en CE (Jiménez *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que en el cultivo endotelial de ratas hembras y machos en condición de obesa no efecto la producción de NO, aunque se presentó una tendencia a incrementar; sin embargo, existen estudios en modelos murinos donde se ha evaluado el impacto de la obesidad inducida por dietas ricas en grasa en la modulación de la vía del NO, y donde las CE presentaron un aumento de la biodisponibilidad de NO, sugiriendo que esto puede representar un mecanismo de adaptación para equilibrar el desenlace vascular perjudicial ocasionado por las dietas hipercalóricas, principalmente el estrés oxidativo (Bruder, 2011).

Por otra parte, se asocia que la leptina también es capaz de activar directamente la producción de NO en vasos y de esa activación depende la integridad endotelial. Por lo tanto, la hiperleptinemia observada en animales alimentados con una dieta rica en grasa, puede ser parcialmente responsable del aumento en la producción de NO endotelial (Bruder 2011).

El cultivo endotelial de hembras OB expuesto con 10 nM de estradiol presentó una disminución en la producción de NO. Algunos estudios mencionan que la alteración de la relajación dependiente del endotelio debida a la disminución de la síntesis del óxido nítrico

(NO) constituye el fenómeno más temprano y la más importante característica de la disfunción endotelial. Actualmente se tiene evidencia que indica que las bajas concentraciones de NO están relacionadas con la ingestión de grasas saturadas, ya que los niveles elevados de LDL oxidada alteran la actividad de la eNOS. Las LDL no modificadas son capaces de inducir elevados niveles de caveolina-1, esta última es una proteína integral de la membrana que se enlaza a eNOS (unión en la caveola) impidiendo la interacción de ésta con la calmodulina y en consecuencia disminuyen la producción de NO por parte de la enzima (Acosta *et al.*, 2006). En contraste, en otro estudio se menciona que las bajas concentraciones de NO son normalmente generadas por eNOS y se considera que tiene efectos benéficos para el endotelio (Langouche, 2005).

Los resultados en el cultivo endotelial de machos OB con el tratamiento 10 nM de estradiol presentó un aumento en la producción de NO. Sugiriendo un predominio del proceso inflamatorio con el mecanismo de respuesta endotelial a estrógenos, ya que se ha demostrado en otros trabajos que la activación crónica de las CE puede incrementar la iNOS y en consecuencia la liberación de NO. La iNOS prácticamente no existe en condiciones fisiológicas, pero puede ser inducida por mediadores inflamatorios y presentarse en CE, formando NO en altas cantidades, produciendo peroxinitrito (ONOO^-) con capacidad para producir citotoxicidad en la célula endotelial (Gosgnach *et al.*, 2000).

La relevancia clínica de las alteraciones de la síntesis y de la biodisponibilidad del óxido nítrico en el curso de la disfunción endotelial se fundamenta en que esta variación es un factor común en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad (Acosta *et al.*, 2006).

La producción de NO está relacionada con el $\text{ER}\alpha$, estimulando la transcripción de genes blanco a través de la vía AF-1, AF-2 o ambas. De esta manera, AF-1 que se expresa en CE y es suficiente para mediar la estimulación de la producción de NO por el estradiol (Arnal, 2010). El estradiol no solo regula la actividad vasodilatadora dependiente del endotelio mediante el NO, sino que también se describe que regula la producción de PGI_2 tanto por COX-1 especulándose que confiere un efecto protector en la aterosclerosis (Egan, 2004).

Expresión de COX-2 mediante *Western Blot*

La COX-2 es una enzima que normalmente no es detectable en muchos tejidos pero exhibe niveles de expresión basal en células endoteliales, macrófagos, arteria coronaria, corazón, páncreas y riñón. La expresión de la COX-2 es inducida por diversos estímulos inflamatorios como es el TNF- α , esta enzima tiene como función mediar los procesos inflamatorios y la señalización de prostanoïdes (Menter *et al.*, 2010). Estudios previos del laboratorio permitieron establecer que la leptina, en concentraciones 10^{-10} a 10^{-8} M / 48h, es capaz de inducir la expresión de COX-2 en cultivos de CE y que esto es representativo de disfunción endotelial (Manuel *et al.*, 2013).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se encontró un aumento en la expresión de COX-2 en CE de hembras OB sin estradiol, con respecto al grupo control, este experimento *in vitro* mostró que la adición de leptina provocó un incremento significativo en la expresión proteica de COX-2, lo que demuestra que en ratas OB y envejecidas si se genera un signo de disfunción endotelial.

Recientemente se investigó la regulación de COX-2 por estradiol en el ovocito de la rata. Se encontró que COX-2 se expresó principalmente antes de la ovulación, periodo controlado por los estrógenos; la exposición de CE con estradiol incremento los niveles de proteína de COX-2 (Pérez *et al.*, 2006).

En este trabajo se observó que el cultivo endotelial de hembras OB tratado con 10 nM de estradiol presentó un aumento en los niveles de expresión proteica de COX-2. Este mismo efecto lo presentaron las CE de machos OB expuestas con estradiol 10 nM. Lo que sugiere que la incubación con estradiol *in vitro* en condición de obesidad potencia el proceso inflamatorio y la disfunción endotelial, además este efecto se potencio en el grupo tratado con estradiol 100 nM sobre todo en ratas macho donde se presentó el efecto máximo en los niveles de expresión proteica de COX-2, lo cual sugiere que la obesidad y niveles elevados de estradiol conducen a la disfunción endotelial que en nuestro modelo parece ser más marcada en machos. Por otro lado, un estudio con análisis de microarreglos de DNA determino la expresión de COX-1 y COX-2 en células procedentes de cordón umbilical (HUVEC) expuestas con 1 nM de

estradiol/ 24 h, los resultados mostraron que la expresión de COX-1 fue inducida por estradiol, mientras que la expresión de COX-2 permaneció inalterada (Sobrino *et al.*, 2009).

Expresión de ICAM-1 mediante *Western Blot*

En presencia de factores de riesgo, el endotelio puede expresar moléculas de adhesión, tales como la ICAM-1 y VCAM-1 que son necesarias para la adhesión de los leucocitos a la superficie endotelial. El endotelio activado también expresa factores quimiotácticos, como la proteína quimioatrayente de los monocitos 1 y otras citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral beta, TNF- β) que contribuyen a la inflamación de la pared arterial y promueve la aterosclerosis (Macías *et al.*, 2003). Al igual que con COX-2, nuestro grupo de trabajo previamente estableció la sobreexpresión de ICAM-1 como un marcador de disfunción endotelial.

En los resultados obtenidos en este estudio, se encontró un incremento en la expresión proteica de ICAM-1 en CE de hembras OB y machos OB, comprobando una asociación de la mayor expresión de las moléculas de adhesión celular con disfunción endotelial. Estas moléculas de inflamación han sido evaluadas como marcadores de riesgo de futuros eventos cardiovasculares (Henn *et al.*, 1998).

En las CE de hembras OB tratadas con 10 nM de estradiol se presentó una disminución en los niveles de expresión proteica de ICAM-1, sugiriendo que estradiol puede inhibir la inflamación inducida por la obesidad y que esto depende de la dosis administrada. Se ha reportado que los estrógenos reducen las concentraciones de la selectina E, VCAM-1 e ICAM-1, lo que puede condicionar un efecto ateroprotector al reducir la adhesión de células blancas a la pared vascular (Lira *et al.*, 2005).

Por otro lado las CE de hembras OB con 100 nM de estradiol mostraron un efecto máximo en la expresión de ICAM-1, lo cual puede estar asociado con los altos niveles de estradiol a los que fueron expuestas las células que, lejos de provocar un efecto benéfico a alta concentración, pueden contribuir a un incremento en el proceso inflamatorio no protector.

En machos OB con 10 nM de estradiol se encontró un aumento significativo en la expresión

proteica de ICAM-1 mismo que se potenció en machos expuestos con estradiol 100 nM presentando un máximo efecto en su expresión; lo anterior, sugiere que los machos son más susceptibles a padecer disfunción endotelial en este modelo. Un tema aún no resuelto es la influencia fisiológica de los andrógenos en la expresión de moléculas de adhesión.

Expresión de receptores de adiponectina mediante *Western Blot*

En los últimos años se ha demostrado que el tejido adiposo produce un elevado número de adipocinas, como adiponectina y leptina, que pueden desempeñar un papel relevante en la fisiopatología de las enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Teijeira *et al.*, 2010).

La adiponectina es una proteína sintetizada por los adipocitos, tiene propiedades anti-inflamatorias (inhibe el factor NF- κ B), antiaterogénicas, antidiabéticas mejorando la resistencia a la insulina y disminuye la acumulación de lípidos. Se ha reportado recientemente que la adiponectina tiene efectos protectores en endotelio (Domínguez, 2007). Se sabe que los niveles plasmáticos de adiponectina se correlacionan inversamente con la obesidad, aterogénesis y enfermedad cardiovascular (Hopkins *et al.*, 2007).

La actividad de la adiponectina se encuentra mediada por la expresión de sus receptores: Adipo R1, el cual se expresa principalmente en el tejido muscular y por Adipo R2 el cual se expresa abundantemente en tejido hepático (Elissondo, 2008).

A nivel *in vitro* se ha demostrado que la adiponectina reduce la unión de los monocitos a la pared endotelial, la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de citocinas proinflamatorias; también inhibe la transformación de los macrófagos en células "espumosas" (Hopkins *et al.*, 2007).

Los resultados en este estudio mostraron un incremento en la expresión de Adipo R1 y Adipo R2 en las CE de hembras OB incubadas con estradiol 100 nM. De esta manera se sugiere que el estradiol puede producir un efecto protector pese a la disfunción endotelial demostrada por la sobreexpresión de COX-2 e ICAM-1.

La expresión de Adipo R1 y Adipo R2 en machos OB expuestos con estradiol 10 nM no presento diferencias significativas con respecto al grupo control y al grupo OB sin estrógenos, en tanto que en el grupo tratado con estradiol 100 nM se observó una disminución muy marcada con respecto a estos grupos, estos datos indican que la incubación con estradiol 100 nM en CE de machos, disminuye de manera drástica la expresión de receptores de adiponectina lo que sugiere que niveles bajos de esta adipocina podrían estar relacionados con el desarrollo de la aterogénesis.

Expresión de receptor de leptina mediante *Western Blot*

La leptina actúa a través del receptor de forma larga OB-Rb y en estudios recientes se asoció que la hiperleptinemia causa disfunción endotelial coronaria (Knudson *et al.*, 2005) y puede desempeñar un papel importante en las enfermedades cardiovasculares asociadas a la obesidad (Beltowski, 2006).

La leptina actúa directamente sobre el endotelio mediante la activación de su receptor específico que a su vez inicia la respuesta molecular relacionada con la producción de factores que intervienen en la respuesta inflamatoria (Manuel *et al.*, 2013).

La expresión proteica del receptor OB-Rb en este trabajo no mostro cambios en las CE de los grupos obesos de ambos sexos. Por otro lado, los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión del receptor OB-Rb, en las CE de hembras OB y machos OB tratados con estradiol 10 nM. Hay varios informes que muestran que la hiperleptinemia se correlaciona positivamente con el proceso aterogénico. En las CE de hembras OB y machos OB tratados con estradiol 100 nM no hubo diferencias significativas en la expresión del receptor OB-Rb con respecto al grupo sin tratamiento con estradiol; lo anterior sugiere que la modulación de la expresión de este receptor por parte de los estrógenos es dependiente de la dosis; se requieren estudios posteriores para conocer las concentraciones adecuadas de estradiol y los mecanismos de modulación que permiten la inhibición de la señalización de la leptina y esto pueda representar una estrategia para disminuir la progresión de la aterosclerosis en sujetos obesos.

En general, este trabajo permitió entender mejor la regulación de diversas moléculas inflamatorias por parte del estradiol en un modelo de obesidad y que los cambios en la respuesta del endotelio están relacionados con el sexo y con la dosis hormonal.

8. CONCLUSIONES

- La dieta hipercalórica administrada, permitió la generación de un modelo experimental de obesidad en ratas Wistar.
- La administración de leptina a los cultivos de CE, generó un modelo de disfunción endotelial caracterizado por un incremento en la expresión de COX-2 e ICAM-1
- En los cultivos de CE de aorta torácica de ratas obesas activadas con leptina y expuestas a estradiol, las concentraciones de NO en el sobrenadante de CE de ratas hembras OB incubadas con estradiol 10 nM mostraron una disminución, mientras que en el cultivo de CE de machos OB se presentó un incremento en la producción de NO, lo que se asocia a protección en hembras y una mayor predisposición a daño endotelial en machos.
- La expresión de COX-2 e ICAM-1 se incrementan significativamente tras el tratamiento con estradiol, lo que sugiere que el proceso de daño endotelial en el modelo, ya no permite la regulación negativa de estas moléculas por parte de los estrógenos.
- El tratamiento con estradiol, induce la sobreexpresión de receptores de adiponectina en hembras, lo cual se asocia a un efecto protector para revertir el daño endotelial, en tanto que en machos se presenta una disminución marcada de estos receptores asociándolo a procesos de disfunción.
- La modulación de los receptores de leptina por parte del estradiol es dependiente de la dosis, tanto en hembras como en machos hubo un aumento en la expresión de OB-Rb a 10 nM lo que se asocia a procesos de aterosclerosis, en tanto a 100 nM la expresión de este receptor se revierte.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta A, Áñez J, Andara C, Bermúdez V y Bermúdez F (2006). Mecanismos moleculares de disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico. Arch Ven Farmacol Terap **25**(2): 54-59.
- Archipoff G, Beretz C, Froger C, De la Salle C, Klein S and Cazenave J (1991). Opposite regulation by cyclic AMP of thrombomodulin and tissue factor activities on the surface of human saphenous vein and endothelial cells in culture [Resumen]. Thromb Haemostasis 65: 349.
- Arnal J, Laurell H, Fontaine C, Billon A, Calippe B, Lenfant F & Gourdy P (2010) Acciones de los receptores de estrógeno en la biología vascular y la inflamación: implicaciones en la fisiopatología vascular. Revista del climaterio **13**(74): 48-55.
- Bastarrachea (2005). Entendiendo las causas de la obesidad a través de la biología celular del adipocito. Rev Venez Endocrinol Metab **3**(3): 20-29.
- Badimón L y Martínez J (2012). Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. Rev Esp Cardiol **55** (Supl 1): 17-26.
- Barrera A, Rodríguez A y Molina M (2013). Escenario actual de la obesidad en México. Rev Med Inst Mex Seguro Soc **51**(3): 292-99.
- Beltowski J (2006). Leptin and atherosclerosis. Atherosclerosis **189** (1): 47-60.
- Bernotiene E, Palmer G and Gabay C (2006). The role of leptin in innate and adaptive immune responses. Arthritis Research and Therapy **8**(5): 217.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry **72**(1), 248-254.
- Brandan C, Llanos I, Miño A, Piccardo P, Ragazzoli A y Ruiz A. El Tejido Adiposo como Órgano Endocrino.
- Bruder (2011). Alteraciones vasculares en ratones obesos por dieta rica en grasa: papel de la vía L-arginina/NO endotelial. Arq Bras Cardiol **97**(1): 40-45.
- Calderón R (2012). Disfunción endotelial. Diagnostico **51**(1): 37-42.
- Campos C. y Sala Mercado J (2005) “Diferencias relacionadas con el sexo”. En: Serra *et al.* Enfermedad Coronaria en la mujer. ¿Dónde están las diferencias? Federación Argentina de Cardiología. Pp 19-20. Tema tomado de la página electrónica el día 13/03/13 <http://www.fac.org.ar/ccvc/llave/libro01/cap02.pdf>.
- Centelles J (2004). Óxido nítrico: Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. Offarm: Farmacia y Sociedad **23**(11): 96-102.
- Córdova J, Barriguete J, Rivera M, Manuell G y Mancha C (2010). Sobrepeso y obesidad. Situación actual y perspectivas. Acta Médica Grupo Ángeles **8**(4): 202-207.
- Clavijo M, Gómez C and Gómez A (2007). Adipogénesis *in vitro* de células 3T3-L0000001. Rev Fac Med **15**(2): 170-176.
- Cracchiolo D, Swick W, McKiernan L, Sloan E, Raina S, Sloan C and Wendell L (2002). Estrogen-dependent growth of a rat pituitary tumor involves, but does not require, a high level of vascular endothelial growth factor. Experimental Biology and Medicine **227**(7): 492-499.
- Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque J, Rami J and Arnal F (2002). Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the α -, but not β -, estrogen receptor. Circulation research **90**(4): 413-419.

- Davignon J and Ganz P (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**(23 Suppl 1):III27-32.
- De Ferranti S and Mozaffarian, D. (2008). The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* **54**(6): 945-55.
- Delgado R, Martínez S. (2009). El estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular: evidencias para un tratamiento más integral. *Rev Cubana Farm.* **43**(1): [aprox. 6 p.].
- Echeverry M, Penagos F and Ruiz T (2012). Role of leptin and its receptor on bovine mammary gland. *Rev Colom Cienc Pecu* **25**(3): 500-510.
- Egan M, Lawson A, Fries S, Koller B, Rader J, Smyth M and Fitz A (2004). COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* **306**(5703): 1954-1957.
- Ergul A. (2002). Endothelin-1 and endothelin receptor antagonist as potential cardiovascular therapeutic agents. *Pharmacotherapy* **25**(1): 500-510.
- Elissondo N, Gomez L, Maidana P y Brites F (2008). Adiponectina: una adipocitocina con múltiples funciones protectoras. *Rev Colomb Cienc Pecu.* **42**(1): 17-33.
- Fernández P, Najib S, Santos J, Romero C, Pérez A, González C and Sánchez V (2010). Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators of inflammation*. doi:10.1155/2010/568343, 8 pages.
- Ferreira R (2006). Estado actual de la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Obtenido de la página electrónica el día 01/08/13 <http://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=39180&pagina=1>
- Ferrer D, Fonseca C, García E y Martínez P (1998). Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN* **2**(3): 45-53.
- Fruhbeck G (2006). Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* **393**(1): 7-20.
- Gryglewsky J, Moncada S and Palmer J (1997). Bioassay of prostacyclin and endothelium derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* **120**(4): 494-503.
- Gosgnach W, Messika D, Gonzalez W, Philippe M and Michel B (2000). Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **279** (6): C1880-C1888.
- Green E, Maffei M, Braden V, Proenca R, De Silva U, Zhang Y and Friedman M (1995). The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Research* **5**(1): 5-12.
- Halaas L, Gajiwala S, Maffei, M, Cohen L, Chait T, Rabinowitz D and Friedman M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**(5223): 543-546.
- Haynes W and Webb (1998). Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of hypertension* **16**(8): 1081-1098.
- Henn V, Slupsky J, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G and Kroczeck A (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* **391**(6667): 591-594.
- Hopkins T, Ouchi N, Shibata R y Walsh K (2007). Actualizan el papel de la adiponectina en la fisiopatología de las enfermedades vasculares. *Cardiovascular Research* **74** (1): 11-18.

- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim, H and Skoda C (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(13): 6231-6235.
- Gómez J y Frubehbeck G (2008). Papel del tejido adiposo en la inflamación asociada a la obesidad. *Revista Española de Obesidad* **6**(5): 264-279.
- Heim H. (1996). The Jak–STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. *European journal of clinical investigation* **26**(1): 1-12.
- Hochstätter E, Antezana E y Franco N (2006). Embarazo y endotelio. *Gac Med Bol* **29**(2): 61-66.
- Jaffe A, Nachman L, Becker G and Minick R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation* **52**(11): 2745.
- Jiménez M, Ochoa C, Pérez H and Acosta E. (2001). El 17-beta estradiol induce la expresión de la sintasa de óxido nítrico tipo III en células endoteliales en cultivo. *Archivos de Cardiología de México* **71**(2): 114-120.
- Knott A and Bossy E (2010). Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **12** (s2): 126-133.
- Kordich L (2006). Rol de la heterogeneidad endotelial en la regulación de la Hemostasia. *Acta Bioquím Clín Latinoam* **40**(3): 317-25.
- Kougiás P, Chai H, Lin P, Yao Q, Lumsden B and Chen C (2005). Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *Journal of Surgical Research* **126**(1): 121-129.
- Kuboki K (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells in vivo. A specific vascular action of insulin. *Circulation* **101**(6): 676-81.
- Knudson D, Dincer D, Zhang C, Swafford N, Koshida R, Picchi A, & Tune D (2005). Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **289**(1): H48-H56.
- Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, Vander S, Wouters J, Skogstrand K and Van den Berghe, G (2005). Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *Journal of Clinical Investigation* **115**(8): 2277-2286.
- Lira C, Gooch L, Olivares A y González L (2005). Modificación de las concentraciones de C3 y C4 luego de la administración de estrógenos conjugados más medroxiprogesterona o raloxifeno en mujeres posmenopáusicas. *Ginecol Obstet Mex* **73**: 521-4.
- Loscalzo J (1995). Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* **333**(1): 251-253.
- Macías C, Villaescusa R, Boffil V, Cordero G, Hernández A y Manuel J (2003). Moléculas de adhesión endoteliales ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina en pacientes con síndrome coronario agudo. *Revista española de cardiología* **56**(2): 137-144.
- Manuel L, López R, Zarate A, Damasio L, Ruiz M, Castillo C, Guevara G y Mera E. (2013). Leptin mediated ObRb receptor increases expression of adhesion intercellular molecules and ciclooxigenasa 2 on murine aorta tissue inducing endothelial dysfunction. *Int J Clin Exper Med* **6**(3): 192-196.
- Manuel L, Zarate A, Rocha L y Hernández M. (2010) Fetal malnutrition affects hypothalamic leptin receptor expression after birth in mice. *Arch Med Res* **41**(4):240-245.

- Manuel L, Zárate A, Hernández M (2012). La leptina, hormona del adipocito, regula el apetito y el consumo de energía. Papel en la obesidad y dismetabolismo. *Acta Médica Grupo Ángeles* **10** (3): 154-157.
- Manuel L, García D, Ruiz-Albarran M, Damasio L y Hernández M (2012). Análisis del NPY hipotalámico inducido por complicaciones nutricionales en la reproducción. *Rev Mex Reprod* **4**(3): 110-115.
- Manzur F, Alvear C y Alayón A (2010). Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología* **17**(5): 207-213.
- Malnick H and Knobler H. (2006). The medical complications of obesity. *Qjm*, **99** (9): 565-579.
- McCarthy M (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiological reviews* **88** (1): 91-134.
- Menter G, Schilsky L and DuBois N (2010). Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clinical Cancer Research* **16**(5): 1384-1390.
- Murad F (2006). Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *The New Engl Journ Med* **355**(19): 2003-11.
- Pérez S, Hermoso M, Farina M, Ribeiro L, Rapanelli M, Espinosa M and Franchi A (2006). 17- β -Estradiol upregulates COX-2 in the rat oviduct. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **80**(3): 155-164.
- Quintero J y Ruiz Z (2008). Efectos de la leptina en el inicio de la pubertad en animales macho. *Rev Colomb Cienc Pecu* **21**(1): 97-108.
- Ross M (2008). *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. Pp. 405- 409.
- Ross R, (1999). Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*. **340**(2): 115-120.
- Salas E y Badimón L (2006). Líneas de investigación en el uso terapéutico del óxido nítrico. *Revista Española de Cardiología Suplementos* **6**(1): 51A-58A.
- Sánchez B (2006). Vías de señalización que participan en la regulación de la lipólisis en adipocitos. *REB* **25**(3): 80-84.
- Sánchez F, García R, Alarcón F and Cruz M. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta médica de México* **141**(6): 505-512.
- Sánchez F *et al.* (2011). Disfunción endotelial asociada al envejecimiento vascular humano. *Clin Invest Arterioscl.* **23**(3): 135-139.
- Shier D, Lewis R and Butler J (2007). *Hole's Anatomy and Physiology*. 11th edition. McGraw Hill; USA. Pag.575. Tema tomado de la página electrónica el día 24/03/13 <http://faculty.stcc.edu/AandP/AP/AP2pages/Units18to20/vessels/blood.htm>
- Schiffrin L, Intengan D, Thibault G and Touyz M (1997). Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Current opinion in cardiology* **12**(4): 354.
- Stauffer L, Westby C and De Souza A (2008). Endothelin-1, aging and hypertension. *Current opinion in cardiology* **23**(4): 350.
- Sobrino A, Mata M, Laguna A, Novella S, Oviedo P, García M, Tarín J, Cano, A and Hermenegildo C (2009). Estradiol Stimulates Vasodilatory and Metabolic Pathways in Cultured Human Endothelial Cells. *PLoS ONE* **4**(12): 1-20.
- Teijeira E, Eiras S, Salgado A, González J (2010). Influencia de los niveles de expresión de adiponectina y leptina en el tejido adiposo epicárdico y subcutáneo sobre el pronóstico cardiovascular. *Rev esp cardiol* **63** supl 3:96.

- Tchernof A (2004). Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk: a review of human studies. *Eur J Endocrinol* **15**(1): 1-14.
- Uotani S, Bjørbaek C, Tornøe J and Flier S (1999). Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* **48**(2): 279-286.
- Valenzuela M (2004). Tejido adiposo: algo más que grasa corporal. *Rev Esp Obes* **2** (6): 327-350.
- Wozniak E, Gee L, Wachtel S and Frezza E (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Digestive diseases and sciences* **54**(9): 1847-1856.
- Yamamoto Y, Imaeda K and Suzuki H (1999). Endothelium-dependent hyperpolarization and intercellular electrical coupling in guinea-pig mesenteric arterioles. *The Journal of physiology* **514** (2): 505-513.
- Zhang Y, Proenca, R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman J (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**(6505): 425-432.