



Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos

**REGULACIÓN POR PPAR γ DE LA EXPRESIÓN VASCULAR
DE COX-2 Y LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE
OXÍGENO EN HIPERTENSIÓN**

TESIS DOCTORAL

Ángela Martín Cortés

2011



Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos

MARÍA JESÚS ALONSO GORDO, Profesora Titular, y **RAQUEL HERNANZ MARTÍN**, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos,

CERTIFICAN:

Que Dña. **ÁNGELA MARTÍN CORTÉS** ha realizado bajo su dirección el trabajo *“Regulación por PPAR γ de la expresión vascular de COX-2 y la producción de especies reactivas de oxígeno en hipertensión”*, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Rey Juan Carlos.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a 4 de Octubre de 2011.

Dra. María Jesús Alonso Gordo
Titular de Universidad

Dra. Raquel Hernanz Martín
Profesora Contratada Doctor

Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Instituto de Salud Carlos III (PI041917), del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2009 07201), Red Temática de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA RD06/0014/0011), Fundación Mutua Madrileña y por una Ayuda para la Realización de Proyectos de Investigación de la Universidad Rey Juan Carlos y la Comunidad de Madrid (URJC-CM2007-BIO-1423). Ángela Martín Cortés es Personal Docente e Investigador en formación de la Universidad Rey Juan Carlos.

*Estando siempre dispuestos a ser felices,
es inevitable no serlo alguna vez.*

Blaise Pascal

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y
no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.*

Mahatma Gandhi

A mi padre

*“Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama”
Aristóteles*

Y así, la palabra “tesis” llega a su destino después de un largo viaje... que echando la vista atrás, mereció la pena emprender. Ahora tengo la oportunidad, a todos los que me habéis acompañado durante estos años, de agradecer la ayuda imprescindible que me habéis prestado para hacer realidad este proyecto.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. María Jesús Alonso permitirme realizar este trabajo bajo su dirección y orientación, no sólo por sus horas de dedicación, su esfuerzo y su apoyo, sino sobre todo, por su cariño. Su capacidad de trabajo y organización y la pasión con la que afronta sus retos han hecho que sea mi referencia permanente. Gracias por confiar en mí, por escucharme cada vez que lo necesité, por enseñarme a dar mis primeros pasos en esto de la investigación y por hacerme más fácil este viaje... Gracias, de corazón, por ser una verdadera maestra. A la Dra. Raquel Hernanz, quien mostró las mismas ganas y tenacidad para sacar esta tesis adelante. Sin su energía, disciplina, supervisión continuas y sin su trabajo esta tarea tampoco hubiese llegado a su fin. Mi reconocimiento también a la Dra. Mercedes Salaices, a quien respeto y admiro, no sólo por el amor que demuestra por su trabajo sino por la virtud que tiene de contagiarnos. Gracias a su respaldo se puede hacer de este “mundo de la ciencia” un “mundo de realidades”. Sin sus críticas y sugerencias, sin su espíritu conciliador, paciencia, consejos y serenidad esta tesis no hubiese sido posible, ni hubiese sido lo mismo.

Y como un largo camino da para mucho, durante este tiempo he tenido el privilegio de conocer a otros grandes maestros. Gracias al Dr. Manuel Ros por hacerme un hueco en su departamento, por hacer frente con eficacia a nuestras necesidades y por hacer posible que todas las ideas tengan cabida. Al Dr. Antonio Coloma por su continuo asesoramiento científico y por su buen humor. A la Dra. Custodia García por mostrar siempre ese compromiso con la ciencia, y naturalmente por su inteligencia crítica. A la Dra. Teresa Fernández, por su generosa ayuda y permanente disponibilidad.

También quiero dar las gracias a tod@s mis compañer@s, a los que están y a los que se han ido, que han contribuido a lo largo de estos años a escribir esta parte de mi historia. A Ana Briones, no sólo por ser ejemplo de carácter, perseverancia, determinación y voluntad firme, sino porque siempre está dispuesta a escuchar y ayudar. A Ana García, porque confió en mí, por esas interminables charlas y por sus continuas muestras de cariño. A Marta, por echarme una mano siempre que lo he necesitado. A Marisol, Sonia, María, Andrea, Laura, Rosa, y a Javito (el chico adoptivo del L4) por su inestimable apoyo y por hacerme sentir siempre como una más. A Amada, por todo su tiempo, por su infinita paciencia a la hora de enseñar, por nuestras conversaciones en el cuarto de cultivos. A Franck, Giulia, Karina, Fernanda y Lorena, los chicos brasileños, gracias por vuestra eterna sonrisa. A Maite, porque su disposición hace que todo sea más llevadero, y por su permanente calma. A Ismael, por todo el tiempo que me ha dedicado, porque desde el primer día he podido contar con su inestimable ayuda. Gracias a todos por vuestra amistad. A Carmen, Adriana, Gema, Eva,

Ana, Daniel, Oscar, José Manuel, Miriam, Nuria, Cris, Yurena y Lucía con quienes he compartido este camino lleno de “docencia”, de emociones y de responsabilidad. Gracias a todos por compartir vuestras experiencias profesionales y personales, por darme el impulso y orientación necesarios para seguir avanzando, por ayudarme en tantas ocasiones. No quiero olvidarme de José Antonio y María, los chicos del CAT, gracias también por su ayuda. Y de Johanna y Juanjo, a quienes invito a disfrutar de su viaje.

Y por último destacar el esfuerzo de mis dos compañeros de batallas, con quienes he trabajado día a día y cuya aportación a esta tesis ha sido imprescindible. A Roberto, por su paciencia, voluntad y por su implicación infinita, ah! y por dejar constancia de todas esas otras virtudes que poseemos cuando dejamos colgadas las batas ;-)... A Vicente, sin cuyo trabajo esta tesis no sería lo que es. Empezamos casi juntos este camino y hemos compartido muchas horas y mucho de “nuestras cosas”. Hemos realizado un trabajo complementario, del que estoy indudablemente orgullosa, y a pesar de nuestros “ires y venires” tú también ocupas un lugar preferente. Espero haber sabido conquistar vuestro afecto y cariño.

Me gustaría agradecer la hospitalidad y ayuda que he recibido de la Dra. Ana Fortuño, el Dr. Guillermo Zalba y sus técnicos, Raquel e Idoia, durante mis estancias por su laboratorio. Gracias también a todos los que me han prestado los medios necesarios para desarrollar este trabajo. Al personal del animalario de la UAM y de la URJC, especialmente a Davinia y Paloma. A Lola, Ana y Susana, las chicas del confocal de la UAM, por su paciencia. A los informáticos, auxiliares y personal de limpieza por la imprescindible labor que realizan y a Silvia, nuestra secretaria, no sólo porque su trabajo nos facilita las cosas, sino por la amabilidad y responsabilidad con que lo lleva a cabo.

Y fuera del laboratorio también he encontrado estímulos más que necesarios para seguir avanzando. Gracias a Beatriz, por enseñarme a interpretar esos protocolos interminables... pero, especialmente, por las horas de risas que nos hemos echado. Me llevo un recuerdo inolvidable. Gracias también a Candi, Paloma, Yoli Aluche, Cris, Yoli Seg y Beatriz por acompañarme desde mucho antes de emprender esta aventura. A Cris, por su apoyo continuo y su enorme cariño. A mi “compañera de pupitre” Beatriz, por todo lo que hemos vivido y aprendido juntas durante estos años. Son tantos los recuerdos que parte de mi historia ha quedado vinculada íntima y profundamente a la suya. A Osvaldo, quien hizo de las “reconstrucciones tridimensionales” una buena amistad. Y a Yoli, no sólo porque fue el nexo con esta tesis sino porque es un ejemplo del buen hacer. Su paciencia, esfuerzo, trabajo, talento, ilusión y sonrisa inquebrantables hacen que por donde pase, nadie se olvide de ella. Y a todos aquellos que, por olvido u omisión habéis estado conmigo, también sois merecedores de un cariñoso reconocimiento por mi parte.

Y finalmente, pero de todo corazón, gracias a mi familia. A ti papá. Tu ausencia me ha enseñado “*El camino de las lágrimas*”, pero también el del autoconocimiento. Gracias por enseñarme a disfrutar de lo bueno y a aprender de lo menos bueno pero, sobre todo, por empujarme siempre a ser feliz ¡¡cuánto te echo de menos!! A ti mamá, por tu

valentía, calor, paciencia, fuerza, sacrificio y amor incondicional (*por quererme como solo una madre sabe hacerlo*). A mis hermanos y amigos, Ana y Luis, gracias por vuestro apoyo y comprensión, por estar siempre. A mis sobrinos Miriam, Marcos y Carla, por hacerme “tía verdadera”, por esos increíbles besos, abrazos y sonrisas y por devolvernos la ilusión. Gracias a mis abuelos, especialmente a mi abuela Lola, mujer luchadora de quien sigo aprendiendo cada día. Gracias también a mi “otra familia”, no menos importante, a mis cuñados Fran y Noemí, por hacer felices a quienes quiero. A José y Juli, por “adoptarme” y prestarme su ayuda desde el primer día, gracias de corazón por todo.

Y por último, mi agradecimiento a mi mejor amigo y confidente, a una de las personas más importantes de mi vida. Gracias Jose por quererme siempre, pero con más ahínco, cuando más lo he necesitado, por “aguantarme” todos estos años, por apoyarme y por comprenderme. Espero tener un buen camino, pero más aún, espero que siempre estés acompañándome. Soy afortunada por todo este tiempo que me has regalado demostrándome siempre tu amor incondicional. Te quiero profundamente.

Y es que la serenidad y madurez, que sólo el paso del tiempo nos brinda, me ha llevado a la convicción de que aunque el éxito no puede asegurarse eternamente si avanzamos con confianza e ilusión, nuestros sueños estarán cada vez más cerca...

Muchas gracias a todos por vuestra compañía en este apasionante viaje,
Ángela

ÍNDICE

ABREVIATURAS	25
RESUMEN	31
INTRODUCCIÓN	37
1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PARED ARTERIAL	38
1.1. CAPAS DE LA PARED ARTERIAL	38
1.2. MATRIZ EXTRACELULAR	40
2. MEDIADORES QUE REGULAN EL TONO VASCULAR	40
2.1. ÓXIDO NÍTRICO	44
2.2. PROSTANOIDES	47
2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	51
2.3.1. Anión superóxido	54
2.3.2. Peróxido de hidrógeno	58
2.3.3. Radical hidroxilo	60
2.3.4. Peroxinitrito	60
2.4. OTROS MEDIADORES	61
2.4.1. Sistema renina-angiotensina	61
2.4.2. Factor hiperpolarizante derivado de endotelio	63
2.4.3. Endotelina	64
2.4.4. Citoquinas	66
3. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL	67
3.1. LA HIPERTENSIÓN COMO ENFERMEDAD INFLAMATORIA	68
3.2. CAMBIOS ESTRUCTURALES, MECÁNICOS Y FUNCIONALES VASCULARES ASOCIADOS CON LA HIPERTENSIÓN	69
3.3. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA VÍA DE LA NOS	72
3.4. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA VÍA DE LA COX	72
3.5. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ROS	74
4. RECEPTORES ACTIVADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS	78
4.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RECEPTORES PPAR	79
4.1.1. Activación génica dependiente de ligando	79
4.1.2. Represión génica dependiente de ligando	80
4.1.3. Represión génica independiente de ligando	83
4.2. PPAR γ	84
4.2.1. Efectos metabólicos	85
4.2.2. Efectos antiinflamatorios	87
4.2.3. PPAR γ y COX-2	90
4.2.4. PPAR γ e hipertensión	91
4.3. PPAR α	94
4.4. PPAR β/δ	96
OBJETIVOS	99

<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	105
1. MATERIAL BIOLÓGICO	105
2. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL	107
3. CULTIVOS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS	107
3.1. OBTENCIÓN DE LAS CMLV	107
3.2. CRECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLV	108
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMLV	109
3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN CMLV	110
4. CULTIVO DE FIBROBLASTOS ADVENTICIALES	111
4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN FIBROBLASTOS ADVENTICIALES	112
5. MIOGRAFÍA DE PERFUSIÓN	112
5.1. CÁLCULOS DE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES Y MECÁNICOS	113
5.2. ESTUDIO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA DISTRIBUCIÓN NUCLEAR	115
6. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR	116
6.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	117
7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOPASMÁTICOS	118
8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	119
9. TRANSFECCIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA ESPECÍFICO PARA PPARγ DE CULTIVOS DE CMLV DE SHR	122
10. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm	123
11. INMUNOFLUORESCENCIA	125
12. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO	126
12.1. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO POR LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA EN CULTIVOS DE CMLV	128
13. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H₂O₂	128
14. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROSTANOIDES E ISOPROSTANOS	130
15. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN PLASMA	131
16. EXPRESIÓN DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA	132
17. SOLUCIONES Y FÁRMACOS UTILIZADOS	133

RESULTADOS	139
1. TRATAMIENTO AGUDO CON AGONISTAS PPARγ DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS	139
1.1. EFECTO DE IL-1 β SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2	139
1.2. EFECTO DE IL-1 β SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	140
1.2.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de NOX-1	140
1.2.2. Efecto de IL-1β sobre la actividad NAD(P)H oxidasa	140
1.2.3. Efecto de IL-1β sobre la producción de O$_2^{\cdot-}$	142
1.2.4. Efecto de IL-1β sobre la producción de H$_2$O$_2$	143
1.3. PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL EFECTO DE IL-1 β SOBRE COX-2	144
1.4. EFECTO DE H $_2$ O $_2$ SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2	147
1.5. PARTICIPACIÓN DE NF- κ B EN LA EXPRESIÓN DE COX-2	148
1.6. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPAR α SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1 β	151
1.7. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPAR γ SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1 β	152
1.7.1. Efecto del silenciamiento con siRNA de PPARγ sobre la expresión de ARNm de PPARγ inducida por IL-1β	154
1.7.2. Efecto del silenciamiento con siRNA de PPARγ sobre la expresión de ARNm de COX-2 inducida por IL-1β	155
1.7.3. Efecto de los agonistas PPARγ sobre la expresión de COX-2	156
1.8. EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS INDUCIDA POR IL-1 β	157
1.8.1. Efecto de pioglitazona sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1β	157
1.8.2. Efecto de pioglitazona sobre la actividad NAD(P)H oxidasa inducida por IL-1β	158
1.8.3. Efecto de pioglitazona sobre la producción de O$_2^{\cdot-}$ inducida por IL-1β	159
1.8.4. Efecto de pioglitazona sobre la producción de H$_2$O$_2$ inducida por IL-1β	160
1.9. EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR H $_2$ O $_2$	161
1.10. EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ EN LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B	161
2. TRATAMIENTO CRÓNICO DE RATAS SHR CON PIOGLITAZONA	163
2.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL	163
2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE EL REMODELADO Y RIGIDEZ VASCULAR DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA	164
2.2.1. Estructura	164
2.2.2. Mecánica	166

2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LAS RESPUESTAS VASCULARES_____	167
2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE DERIVADOS DE COX-2 EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA_____	168
2.4.1. Expresión y localización vascular de COX-2_____	168
2.4.2. Participación de COX-2 en la respuesta vascular a fenilefrina_____	170
2.4.3. Identificación de los prostanoïdes implicados en el efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la respuesta vascular a fenilefrina_____	171
2.4.3.1. Participación de los receptores EP ₁ /EP ₃ _____	171
2.4.3.2. Participación del receptor TP_____	172
2.4.3.3. Participación de tromboxano_____	173
2.4.3.4. Medida de los niveles de PGF _{2α} y 8-isoprostano_____	174
2.4.3.5. Participación de prostaciclina_____	175
2.4.3.6. Papel del endotelio_____	180
2.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA_____	182
2.5.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión vascular de NOX-1_____	185
2.5.2. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la producción de O₂⁻ y de malondialdehído_____	185
2.5.3. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión vascular de SOD y catalasa_____	187
2.6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA_____	188
2.6.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de eNOS_____	190
2.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE PPAR_____	190
<i>DISCUSIÓN</i> _____	195

1. TRATAMIENTO AGUDO CON AGONISTAS PPARγ DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS_____	195
1.1. EFECTO DE IL-1β SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2_____	195
1.2. EFECTO DE IL-1β SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO_____	197
1.3. PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL EFECTO DE IL-1β SOBRE COX-2_____	199
1.4. PARTICIPACIÓN DE NF-κB EN EL EFECTO DE IL-1β Y H ₂ O ₂ SOBRE COX-2_____	201
1.5. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR PPAR EN CMLV DE RATAS WKY Y SHR_____	203

1.5.1. Efecto de los agonistas PPAR α y PPAR γ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β _____	204
1.5.2. Efecto del agonista PPAR γ pioglitazona sobre la producción de ROS inducida por IL-1 β _____	207
1.5.3. Efecto de pioglitazona en la señalización NF- κ B _____	208
2. TRATAMIENTO CRÓNICO DE RATAS SHR CON PIOGLITAZONA _____	211
2.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL_____	211
2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE EL REMODELADO Y RIGIDEZ VASCULAR DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA_____	213
2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LAS RESPUESTAS VASOCONSTRICTORAS_____	214
2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE DERIVADOS DE COX-2 EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA_____	216
2.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA_____	225
2.6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA_____	228
CONCLUSIONES _____	235
BIBLIOGRAFÍA _____	239
ANEXO _____	275

ARTÍCULO 1: **Martín A**, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Palacios R, Briones AM, Fortuño A, Zalba G, Salaices M, Alonso MJ. PPAR γ activation reduces COX-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens*. En revisión.

ARTÍCULO 2: Hernanz R, **Martín A**, Pérez-Girón JV, Palacios R, Briones AM, Miguel M, Salaices M, Alonso MJ. Pioglitazone treatment increases COX-2 derived PGI $_2$ production and reduces oxidative stress in hypertensive rats. Role on vascular function. *Br J Pharmacol*. En revisión.

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio libre intracelular
15d-PGJ₂: 15-deoxi-delta-12,14-prostaglandina J₂
AA: ácido araquidónico
AC: adenilato ciclasa
ADN: ácido desoxirribonucleico
AMPc: adenosín monofostafa cíclico
AMR: arterias mesentéricas de resistencia
Ang II: angiotensina II
AP-1: proteína activadora-1
Apo: apolipoproteína
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BH₄: tetrahidrobiopterina
C/EBP: proteína de unión a la secuencia *enhancer* CCAAT
CaM: calmodulina
Ca_v: canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje
CBP: proteína de unión a CREB
CE: célula endotelial
CML: células musculares lisas
CMLV: células musculares lisas vasculares
COX: ciclooxigenasa
CPT: carnitina palmitoil transferasa
CRE: elemento de respuesta a AMP cíclico
CREB: proteína de unión a CRE
Cu/Zn-SOD: cobre/zinc-superóxido dismutasa
DAG: diacilglicerol
DBD: dominio de unión a ADN
DCF: diclorofluoresceína
DHA: ácido docosahexaenoico
DHE: dihidroetidido
DPI: yoduro de difenileno
ECA: enzima convertidora de angiotensina
ECE: enzima convertidora de endotelina
EC-SOD: extracelular-superóxido dismutasa
EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EDRF: factor relajante derivado de endotelio
EET: ácido epoxieicosatrienoico
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EMEA: agencia europea de medicamentos
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
EPA: ácido eicosapentaenoico
ERK: proteína quinasa activada por señales extracelulares
ET: endotelina
FAD: flavín adenín dinucleótido
FMN: flavín mononucleótido
GCs: guanilato ciclasa soluble
GMPc: guanosín monofosfato cíclico
GPx: glutatión peroxidasa

H₂O₂: peróxido de hidrógeno o agua oxigenada
HDL: lipoproteína de alta densidad
HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico
HIF-1: factor inducido por hipoxia-1
HODE: hidroxiocadecadienoico
ICAM: molécula de adhesión celular inducible
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1
IKK: quinasa del inhibidor de NF-κB
IL: interleuquina
INF-γ: interferón-γ
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato
IκB: inhibidor de NF-κB
JNK: proteína quinasa del extremo N terminal de c-jun
K_{ATP}: canales de K⁺ sensibles a ATP
K_{Ca}: canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺
KHS: solución Krebs-Henseleit
K_V: canales de K⁺ dependientes de voltaje
L-Arg: L-arginina
LBD: dominio de unión a ligando
LDL: lipoproteína de baja densidad
LEE: lámina elástica externa
LEI: lámina elástica interna
LPL: lipoproteína lipasa
LPS: lipopolisacárido bacteriano
LTB₄: leucotrieno B₄
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1: proteína quimioattractiva de monocitos-1
MDA: malondialdehído
MLC₂₀: cadena ligera de la miosina
MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MMP: metaloproteínasa de matriz
Mn-SOD: manganeso-superóxido dismutasa
NAC: N-acetil cisteína
NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCoR: correpressor nuclear
NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados
NF-κB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
O₂⁻: anión superóxido
OH·: radical hidroxilo
ONOO⁻: peroxinitrito
PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno
PBP: proteína de unión a PPAR

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
 PGC-1: coactivador del receptor activador de la proliferación de peroxisomas gamma-1
 PGD₂: prostaglandina D₂
 PGE₂: prostaglandina E₂
 PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}
 PGG₂: prostaglandina G₂
 PGH₂: prostaglandina H₂
 PGHS: prostaglandina endoperóxido H sintasa
 PGI₂: prostaglandina I₂ o prostaciclina
 PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa
 PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
 PKA: proteínas quinasas dependientes de AMPc
 PKC: proteína quinasa C
 PKG: proteínas quinasas dependientes de GMPc
 PLA₂: fosfolipasa A₂
 PLC: fosfolipasa C
 PMA: 12-miristato 13-acetato forbol
 PMCA: Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática
 PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas
 PPRE: elemento de respuesta a PPAR
 ROS: especies reactivas de oxígeno
 RS: retículo sarcoplásmico
 RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
 RXR: receptor X del ácido cis-retinoico
 SERCA: Ca²⁺-ATPasa de la membrana del retículo sarcoplásmico
 SHR: rata espontáneamente hipertensa
 SMRT: mediador-silenciador de los receptores de retinoide y hormona tiroidea
 SOD: superóxido dismutasa
 SP-SHR: stroke prone-SHR
 SRA: sistema renina-angiotensina
 SRC-1: receptor coactivador esteroideo-1
 STAT: proteína transductora de señal y activadora de la transcripción
 TBP: proteína de unión a TATA
 TGF-β: factor de crecimiento tumoral-β
 TNF-α: factor de necrosis tumoral-α
 TXA₂: tromboxano A₂
 TZD: tiazolidinediona
 VCAM: molécula de adhesión celular vascular
 VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
 VLDL: lipoproteína de muy baja densidad
 WKY: rata Wistar-Kyoto
 XO: xantina oxidasa

RESUMEN

La hipertensión arterial se considera la enfermedad cardiovascular más extendida, con una prevalencia que oscila entre el 20 y el 30% de la población adulta en los países industrializados. Es uno de los factores de riesgo más importantes tanto en la enfermedad coronaria como en los accidentes cerebrovasculares. En los últimos años la hipertensión se ha considerado una enfermedad inflamatoria crónica, habiéndose descrito elevados niveles de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina-1 β (IL-1 β), de mediadores proinflamatorios circulantes como la angiotensina II y de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como alteraciones en la actividad de factores de transcripción redox-sensibles como el factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B (NF- κ B) implicados en la expresión de citoquinas y de enzimas proinflamatorias como la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2). Todo ello podría estar implicado en las alteraciones vasculares, tanto funcionales como estructurales, que acompañan a esta enfermedad. Por otra parte, se ha especulado que la expresión de los receptores nucleares activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR), con efectos cardioprotectores y antiinflamatorios, puede estar disminuida en vasos sanguíneos de animales hipertensos, lo que contribuiría al aumento en la proliferación, migración, inflamación y fibrosis características de esta patología. Las acciones antiinflamatorias de la activación de estos receptores pueden llevarse a cabo a través de la reducción del estrés oxidativo y de la activación de factores de transcripción proinflamatorios implicados en la expresión de COX-2. Así, los PPAR son dianas clave en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento antihipertensivo.

El objetivo general de este trabajo ha sido analizar la modulación por PPAR γ de la expresión de COX-2 y del estrés oxidativo así como su papel en las alteraciones vasculares asociadas a la hipertensión. Para ello, se han utilizado: 1) cultivos celulares primarios obtenidos de células de músculo liso vascular (CMLV) de aorta de ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR) estimulados con la citoquina proinflamatoria IL-1 β en ausencia y en presencia de agonistas PPAR γ y 2) segmentos de la tercera rama de la arteria mesentérica de ratas WKY y SHR tratadas o no con el agonista PPAR γ pioglitazona.

Los principales hallazgos han sido:

- 1) La exposición de CMLV a IL-1 β incrementa la expresión de COX-2, siendo este efecto mayor en células de SHR.
- 2) El aumento en la expresión y actividad de la NAD(P)H oxidasa y en la producción de O₂⁻ contribuye a la inducción de COX-2 por IL-1 β en células de ambas cepas. En células de SHR, pero no de WKY, la exposición a IL-1 β aumenta la producción de H₂O₂, que también participa en la inducción de COX-2. Esto puede explicar la mayor inducción de la expresión de COX-2 por IL-1 β observada en SHR.
- 3) En cultivos celulares de SHR, IL-1 β aumenta la expresión nuclear de la subunidad de NF- κ B p65 así como la expresión de p-IKK, por mecanismos dependientes de ROS. Este factor de transcripción participa en la expresión de COX-2 inducida tanto por IL-1 β como por H₂O₂.
- 4) La activación de PPAR γ reduce la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β por disminuir los niveles de ROS debido a la reducción de la expresión de NOX-1 y de la actividad de la NAD(P)H oxidasa, así como por reducir la activación del factor redox-sensible NF- κ B.
- 5) El tratamiento de ratas SHR con pioglitazona no modifica la presión arterial ni las alteraciones estructurales y mecánicas observadas en AMR de ratas SHR.
- 6) El tratamiento de ratas SHR con pioglitazona no modifica la respuesta a fenilefrina. Sin embargo, dicho tratamiento aumenta la producción endotelial de PGI₂, como consecuencia del aumento de la expresión de COX-2, así como su participación en la respuesta a fenilefrina actuando a través del receptor TP. Además, pioglitazona reduce la expresión de NOX-1 y aumenta los niveles de la enzima detoxificante catalasa, reduciendo la producción de ROS y su participación en la respuesta a fenilefrina, al tiempo que aumenta el papel de NO en dicha respuesta y mejora la disfunción endotelial observada en SHR.
- 7) El tratamiento con pioglitazona incrementa los niveles de PPAR γ reducidos en SHR.

En conclusión, los resultados de este trabajo aportan nuevos datos sobre las alteraciones que se observan con la hipertensión, los mecanismos implicados en las mismas y su modulación por agonistas PPAR γ . La reducción del estrés oxidativo, que puede incrementar la biodisponibilidad del NO, así como el efecto sobre la expresión de COX-2 puede también contribuir a las acciones protectoras de las glitazonas ampliamente descritas en varias patologías cardiovasculares. Aunque en nuestras condiciones experimentales PGI₂ actúa como vasoconstrictor, niveles incrementados de este prostanoides serían beneficiosos puesto que ejerce un papel cardioprotector importante a través de la inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria y por sus efectos pleiotrópicos sobre el músculo liso vascular. Estudios adicionales son necesarios para evaluar las potenciales implicaciones de dichos agonistas en pacientes hipertensos.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial se caracteriza por un incremento de la resistencia vascular periférica asociado con alteraciones vasculares estructurales, mecánicas y funcionales, lo que contribuye al aumento del riesgo de accidentes cardiovasculares (Marchesi y cols., 2008; Paravicini y Touyz, 2008). En los últimos años la hipertensión se ha definido como una enfermedad de naturaleza inflamatoria, con niveles incrementados de citoquinas circulantes (Sanz-Rosa y cols., 2005) y mediadores proinflamatorios como angiotensina II (Ang II) (Ruiz-Ortega y cols., 2006), así como una elevada expresión y actividad de enzimas proinflamatorias como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Alvarez y cols., 2007; Jaimes y cols., 2008). Asociado a este estado proinflamatorio se encuentra un incremento en el estrés oxidativo plasmático y vascular (Paravicini y Touyz, 2008). El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es responsable de la activación de factores de transcripción como el factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B (NF- κ B) (Bowie y O'Neill, 2000; Beswick y cols., 2001b), implicado en la inducción de la expresión de citoquinas como interleuquina-1 β (IL-1 β) y de enzimas como COX-2, importantes mediadores de la respuesta inflamatoria (Tsatsanis y cols., 2006). Todo ello puede contribuir a las alteraciones vasculares estructurales y funcionales observadas en esta patología.

Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) son receptores nucleares que se expresan en los distintos tipos celulares de la pared vascular y cuya actividad cardioprotectora y antiinflamatoria está ganando cada vez más relevancia. En este sentido, los PPAR son capaces de reducir el estrés oxidativo (Sung y cols., 2006) y antagonizar las rutas de activación de factores de transcripción proinflamatorios implicados en la expresión y liberación de citoquinas (Ricote y cols., 1999) o en la expresión de COX-2 (Cuzzocrea y cols., 2004).

En esta introducción se hará una revisión de los diferentes mecanismos que regulan el tono vascular, las alteraciones vasculares observadas con la hipertensión y los factores implicados en dichas alteraciones, así como el papel que desempeñan los PPAR en la regulación de la respuesta inflamatoria vascular.

1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PARED ARTERIAL

La pared de los vasos está formada por tres capas concéntricas bien diferenciadas tanto a nivel estructural como funcional. Desde la luz hasta el exterior del vaso se distinguen la capa interna o íntima, la capa central o media y una capa más externa denominada adventicia. La lámina elástica interna (LEI) separa la capa interna de la media, y la lámina elástica externa (LEE) separa la capa media de la adventicia (Rhodin, 1980) (Fig. 1). Cada capa de células se encuentra embebida en la matriz extracelular que sirve de soporte y de comunicación entre las células. Entre las funciones que poseen los componentes de la pared arterial tenemos la de soporte mecánico, actividad vasomotora, función metabólica e interacción con los elementos de la sangre. La regulación del tono vasomotor se lleva a cabo por la capacidad de las distintas estructuras del vaso de regular el crecimiento de las células del músculo liso, los procesos de agregación plaquetaria y coagulación, la permeabilidad o las interacciones de los leucocitos con la pared vascular.

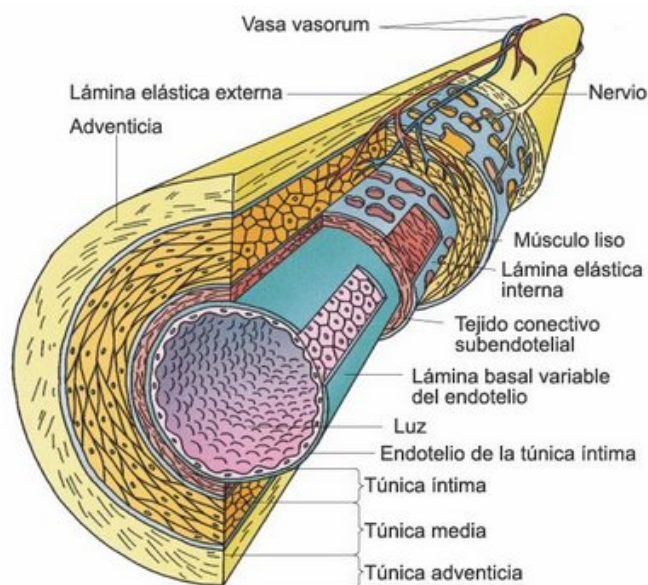


Fig. 1: Esquema representativo de la estructura de la pared arterial.

1.1. CAPAS DE LA PARED ARTERIAL

- La capa íntima, que se encuentra en contacto directo con la sangre circulante, está formada por una monocapa de células endoteliales que descansa sobre una membrana

basal rica en colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Newby, 2005). A su vez, la membrana basal descansa sobre la LEI, muy fina y fenestrada (Briones y cols., 2003). Las células endoteliales se encuentran unidas entre sí mediante uniones estrechas, ocluyentes y uniones tipo *gap* (Telò y cols., 1997) y proporcionan al vaso una capa de revestimiento y una barrera parcialmente selectiva que le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y el resto de células de la pared vascular (Michiels, 2003).

Desde que en 1980 Furchgott y Zawadzki demostraran que la relajación vascular inducida por acetilcolina era dependiente de endotelio, y que este efecto estaba mediado por la liberación desde el endotelio de un factor lábil al que se denominó factor relajante derivado de endotelio (EDRF), identificado posteriormente como óxido nítrico (NO) (Ignarro y cols., 1988), se dejó de pensar en estas células como una simple barrera física entre la sangre y la musculatura vascular. La capa endotelial regula el intercambio de sustancias con los tejidos subyacentes y lleva a cabo una intensa actividad metabólica que ejerce una influencia significativa sobre el tono vascular a través de la liberación de factores tanto vasodilatadores como vasoconstrictores.

- La capa media está formada por células musculares lisas (CML), que contienen filamentos finos de actina y gruesos de miosina y se encuentran embebidas en una matriz extracelular constituida fundamentalmente por fibras de elastina y colágeno incluidas en un gel compuesto por proteoglicanos, ácido hialurónico, glucoproteínas y agua (Rhodin, 1980).

La capa media es la encargada de la actividad vasomotora del vaso. La presencia de uniones tipo *gap* entre las CML asegura una unidad funcional y facilita la coordinación de la contracción (Lagaud y cols., 2002). Estas CML mantienen, además, contacto con las células endoteliales a través de las fenestras de la LEI (Rhodin, 1980).

- La capa adventicia es la capa más alejada de la luz del vaso. Está formada por fibroblastos, mastocitos y haces de colágeno, así como por una red laxa de fibras elásticas. La pared de las arterias elásticas mayores son demasiado gruesas para ser nutridas por difusión desde la luz vascular, por lo que estas arterias poseen una

microvascularización propia llamada *vasa vasorum*. Funcionalmente la adventicia aísla el vaso de otros tejidos y proporciona, además, el soporte de terminaciones nerviosas que penetran en la pared vascular. Recientemente se ha sugerido que esta capa podría jugar un papel importante en la patogenia de algunas enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Yamashita y cols., 2008) y la hipertensión (Arribas y cols., 1997; Li y cols., 2006).

1.2. MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular, además de su función estructural como soporte de las células de la pared del vaso, está implicada en la mecánica y en la función vascular al conferir las propiedades de elasticidad y de resistencia al estiramiento, participar en la hidratación, filtración de iones e interacción con las células y proporcionar factores de crecimiento. Sus componentes son sintetizados por los tres tipos celulares vasculares. Las proteínas más importantes de la matriz son el colágeno y la elastina y en menor proporción se encuentran proteoglicanos, glucoproteínas e integrinas. La elastina dota de elasticidad al vaso, mientras que el colágeno permite a la pared vascular mantener la forma a pesar de la presión intraluminal ejercida por la sangre, por lo que la matriz es un componente importante en la distensibilidad vascular (Rhodin, 1980). A lo largo de la vida adulta, la pared del vaso está expuesta a múltiples factores que pueden dañar la matriz extracelular como la deposición de lípidos, hipoxia, secreción de enzimas, producción de radicales libres y elevación de la presión arterial. En respuesta a estos factores, las CML pueden sintetizar moléculas de la matriz extracelular e inhibidores de las enzimas que las degradan, cambiando su composición y su organización. Esta nueva matriz no es tan adecuada funcionalmente como la sintetizada durante la etapa fetal, alterándose la función vascular normal (Jacob, 2003).

2. MEDIADORES QUE REGULAN EL TONO VASCULAR

La regulación de la actividad contráctil de las células musculares lisas vasculares (CMLV) en la circulación sistémica depende de una compleja interrelación entre estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores como hormonas, neurotransmisores, factores derivados de endotelio y cambios de presión sanguínea.

El principal determinante de la contractilidad del músculo liso vascular es la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Tanto la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular como su salida desde los depósitos intracelulares promueven el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, siendo diversos los mecanismos que originan este aumento. Así, la activación de receptores acoplados a proteínas G por agonistas de naturaleza contráctil promueve la activación de la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2). El DAG estimula la proteína quinasa C (PKC), que participa, entre otros procesos, en la sensibilización al calcio de la maquinaria contráctil, mientras que el IP_3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS) por activación del receptor IP_3 de la membrana del retículo. Por otra parte, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) que se activan por despolarización de la membrana, así como los canales de Ca^{2+} acoplados a receptores, también van a contribuir al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Webb, 2003). Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan, éste se une a la calmodulina (CaM); el complejo Ca^{2+} -CaM se une a la subunidad catalítica de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que se encuentra en forma inactiva, formando así un complejo enzimático (complejo Ca^{2+} -CaM-MLCK) que cataliza la transferencia de grupos fosfato a la cadena ligera de la miosina (MLC_{20}). Esto incrementa la actividad ATPasa de la miosina, la cual interactúa con la actina, induciéndose la contracción muscular (Webb, 2003; Hirano, 2007) (Fig. 2).

La activación de los receptores acoplados a proteínas G no sólo estimula la PLC, sino que también puede activar la fosfolipasa A_2 (PLA_2) y la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA); además, puede activar Rho-quinasas y cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK-Ras). La PKC, Rho-quinasa y MAPK pueden fosforilar directamente la MLC_{20} , incrementando la actividad ATPasa de la miosina. Además el AA, la PKC y la Rho-quinasa inhiben a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), manteniendo de esa forma la fosforilación de la MLC_{20} y consecuentemente la contracción (Abdel-Latif, 2001) (Fig. 2).

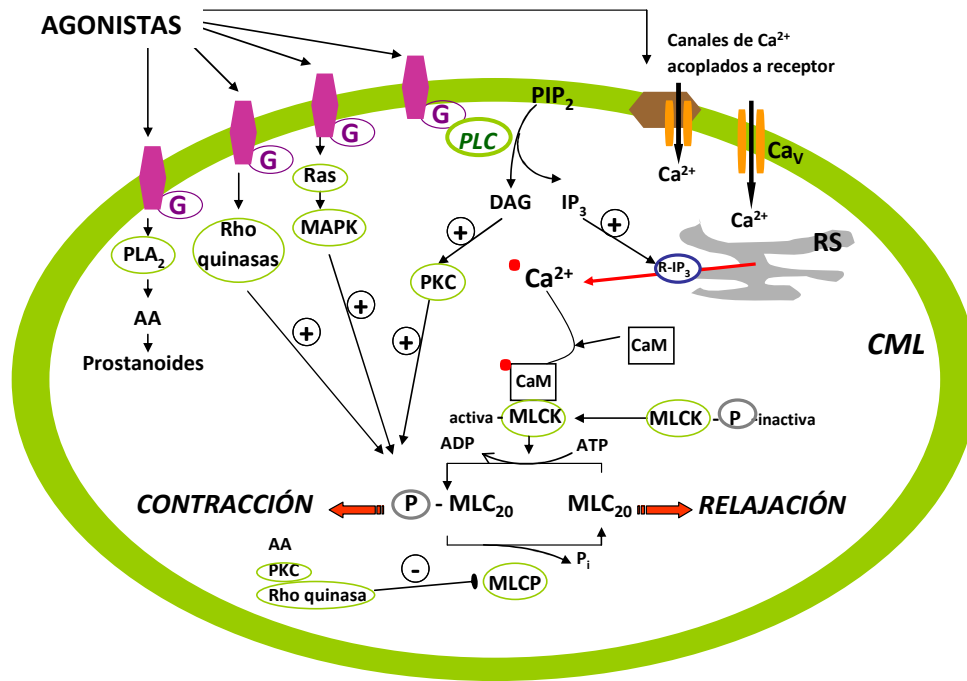


Fig. 2: Esquema de los mecanismos implicados en la contracción y sensibilización al calcio de la maquinaria contráctil del músculo liso vascular. AA: ácido araquidónico; ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; CaM: calmodulina; Ca_v: canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje; CML: célula muscular lisa; DAG: diacilglicerol; IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato; MAPK: proteínas quinasa activadas por mitógenos; MLC: cadena ligera de la miosina; MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina; MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina; PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato; PKC: proteína quinasa C; PLA₂: fosfolipasa A₂; PLC: fosfolipasa C; RS: retículo sarcoplásmico. Adaptado de Abdel-Latif, 2001.

La relajación tiene lugar cuando disminuye la [Ca²⁺]_i como resultado de la eliminación del estímulo contráctil o por la acción directa de sustancias que estimulan la inhibición de los mecanismos contráctiles. Esa disminución se produce por la recaptación del Ca²⁺ intracelular en el retículo sarcoplásmico mediante la Ca²⁺-ATPasa (SERCA) y por la salida de Ca²⁺ al exterior celular a través de la bomba de Ca²⁺ (PMCA) o del intercambiador Na⁺-Ca²⁺ de la membrana plasmática. Esta disminución de la [Ca²⁺]_i conlleva la disociación del complejo Ca²⁺-CaM-MLCK. La MLC₂₀-P es desfosforilada por la MLCP permitiendo que la miosina vuelva a su estado inactivo, produciéndose vasodilatación (Webb, 2003; Hirano, 2007). Múltiples compuestos van a generar segundos mensajeros intracelulares, como los nucleótidos cíclicos adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), que promueven el inicio de cascadas de señalización para producir relajación. Así, el AMPC es el principal mediador de la relajación inducida por agonistas β-adrenérgicos, mientras que el GMPc media la relajación inducida por óxido nítrico (NO), monóxido de carbono y péptidos

natriuréticos (Akata, 2007). La activación de proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) y dependientes de GMPc (PKG) promueve, entre otros efectos, la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ por los siguientes mecanismos: 1) activación de la recaptación de Ca^{2+} por depósitos intracelulares vía fosforilación de la SERCA; 2) incremento de la salida de Ca^{2+} por activación de la PMCA y del intercambiador Na^+-Ca^{2+} ; 3) inhibición de la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico vía fosforilación del receptor IP_3 y/o inhibición de su síntesis; 4) activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (K_{Ca}) en algunos lechos vasculares, lo que produce la hiperpolarización de la membrana celular que conduce a una inhibición de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de Ca_v (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Akata, 2007). Es más, se ha sugerido también la posibilidad de que la PKG pueda directamente fosforilar Ca_v o las proteínas cercanas a ellos, reduciendo la capacidad de apertura de los mismos (Akata, 2007). Otro mecanismo específico por el cual PKG produce relajación es por la activación de la MLCP. Por su parte, la PKA de manera específica puede inhibir a la PLC, disminuyendo la síntesis de IP_3 y de DAG, e inactivar a la MLCK por fosforilación (Akata, 2007).

El endotelio vascular participa activamente en la regulación del tono vascular y de la resistencia periférica mediante la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores en respuesta a estímulos neuronales, humorales, químicos o mecánicos (Le Brocq y cols., 2008), contribuyendo de forma importante al control de la presión arterial (Vallance y cols., 1989) y a la adaptación vascular a los cambios del flujo sanguíneo (Bellien y cols., 2008). Para ello, las células endoteliales liberan diversas sustancias vasoactivas como el NO, prostaciclina (PGI_2), prostaglandina E_2 (PGE_2) y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), que son potentes vasodilatadores (Félétou y Vanhoutte, 2007), y otras, como el péptido endotelina (ET), prostanoides como el tromboxano A_2 (TXA_2) y la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y los componentes del sistema renina-angiotensina (SRA), que son vasoconstrictores (Andresen y cols., 2006). Además, las ROS, generadas por las tres capas de la pared vascular, participan también en la modulación del tono vascular, produciendo tanto vasodilatación como vasoconstricción en función de la especie reactiva de oxígeno y del lecho vascular (Paravicini y Touyz, 2008). Por otra parte, el endotelio está implicado en

la regulación de la inflamación local, en los procesos de adhesión celular, en el remodelado vascular, en la agregación plaquetaria y en la coagulación.

A continuación se comentan los factores endoteliales más relacionados con este trabajo.

2.1. ÓXIDO NÍTRICO

La estructura de radical libre con un electrón desapareado que tiene el NO le confiere una elevada reactividad, siendo uno de los mediadores claves de la relajación vascular.

La óxido nítrico sintasa (NOS) es la enzima encargada de sintetizar NO y L-citrulina a partir de L-arginina (L-Arg) y se requieren nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NAD(P)H], flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH_4) y calmodulina como cofactores (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Andrew y Mayer, 1999) (Fig. 3). En situación de déficit de sustrato o por déficit u oxidación de cofactores como BH_4 , esta enzima puede generar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Yoneyama y cols., 2001; Wolin y cols., 2002) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Matoba y cols., 2000). A su vez, la interacción entre NO y $O_2^{\cdot-}$ forma peroxinitrito ($ONOO^-$), una especie altamente reactiva (Nathan, 1997).

Existen 3 isoformas de la enzima NOS que se diferencian en su expresión y actividad. Dos de ellas se expresan de forma constitutiva, la isoforma NOS endotelial (eNOS), expresada principalmente en el endotelio vascular y plaquetas, y la isoforma NOS neuronal (nNOS), expresada fundamentalmente en neuronas del sistema nervioso central y periférico. La tercera isoforma es la isoforma NOS inducible (iNOS), descrita en macrófagos, en células endoteliales, neutrófilos y en CML durante estados de inflamación o tras la estimulación con agentes inflamatorios (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997).

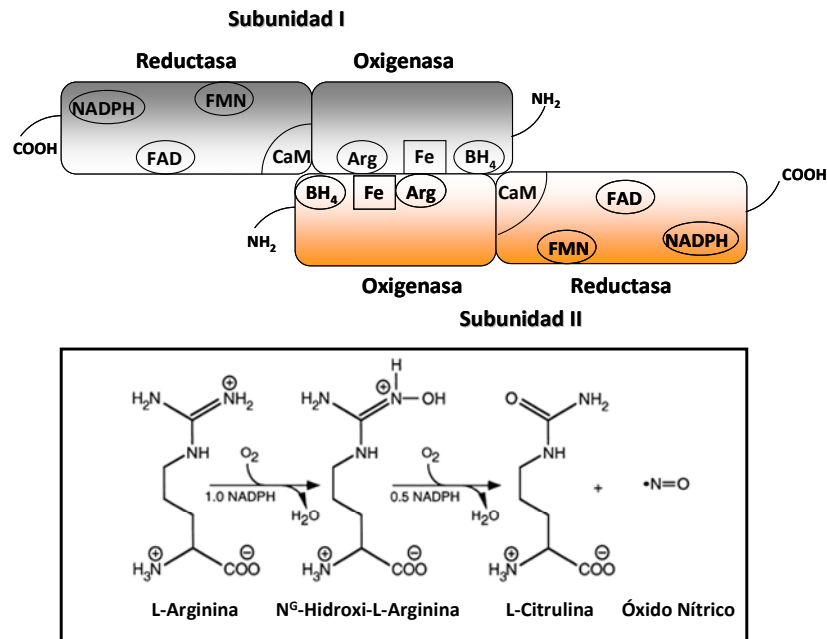


Fig. 3: Esquema de la estructura dominio de NOS mostrando los sitios de unión de cofactores y sustrato. En la parte inferior se muestra la reacción de síntesis del óxido nítrico. Arg: arginina; BH₄: tetrahidrobiopterina; CaM: calmodulina; FAD: flavín adenín dinucleótido; Fe: ion hierro; FMN: flavín mononucleótido; NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Adaptado de Andrew y Mayer, 1999.

En situación fisiológica es fundamental la liberación de NO, el cual participa en el mantenimiento del tono del músculo liso vascular, en la regulación de la distribución del flujo sanguíneo en los lechos vasculares y en la regulación de la resistencia periférica contribuyendo, de este modo, al control de la presión arterial. Además, el NO tiene propiedades vasoprotectoras y antiateroscleróticas, ya que inhibe la agregación y adhesión plaquetaria en la pared vascular (Li y Förstermann, 2000; Moncada y Higgs, 2006).

En el endotelio este mediador es sintetizado por acción de la eNOS tanto en condiciones basales como tras ser activada por diversos agonistas o por el rozamiento producido por el flujo sanguíneo, lo que produce aumento de la [Ca²⁺]_i endotelial (Li y Förstermann, 2000). Así, se ha demostrado que el NO participa en la relajación dependiente de endotelio inducida por bradiquinina (Briones y cols., 2002a) y acetilcolina (Leung y cols., 2006) en diferentes lechos vasculares. Asimismo, modula las respuestas vasoconstrictoras inducidas por diferentes agonistas, como fenilefrina

(Wiggers y cols., 2008), noradrenalina (Xavier y cols., 2004) o H_2O_2 (Rodríguez-Martínez y cols., 1998).

Una vez sintetizado, el NO difunde a la capa media donde produce vasodilatación a través de diferentes mecanismos, dependientes e independientes de GMPc. Por un lado, el NO activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la subsiguiente producción de GMPc, principal mecanismo intracelular por el que el NO produce relajación. Éste activa a la PKG que disparará una serie de reacciones de fosforilación que en última instancia provocan la relajación de las células musculares lisas (Akata, 2007) como consecuencia de la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ y la reducción de la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil, como ya hemos comentado. Además, el NO puede provocar relajación por activar directamente canales de K^+ provocando así hiperpolarización de la membrana, que conduce a una inhibición de la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular a través de Ca_v (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Akata, 2007) (Fig. 4).

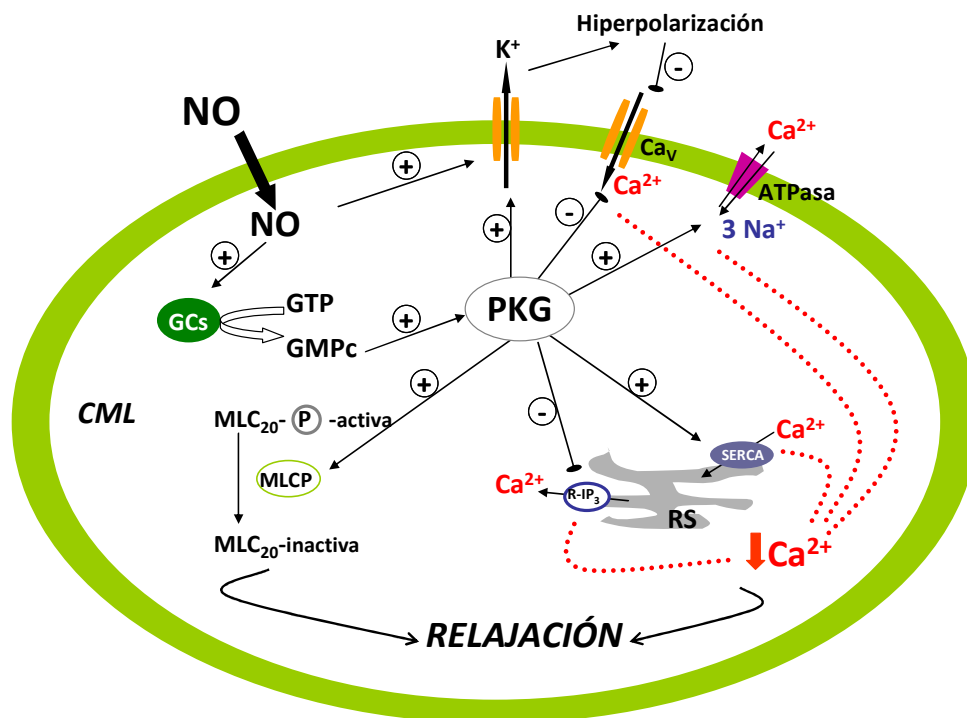


Fig. 4: Mecanismos de relajación inducidos por el NO. Ca_v : canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; CML: célula muscular lisa; GCs: guanilato ciclasa soluble; GMPc: guanosín monofosfato cíclico; GTP: guanosín trifosfato; IP_3 : inositol 1,4,5-trifosfato; MLC_{20} : cadena ligera de la miosina; $MLC-P$: cadena ligera de la miosina fosforilada; NO: óxido nítrico; PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc; SERCA: Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico.

2.2. PROSTANOIDES

Son una familia de compuestos liposolubles sintetizados en la mayoría de las células del organismo que actúan como mediadores lipídicos autocrinos y paracrinos. Están implicados en la maduración del óvulo, inducción al parto, generación de fiebre y regulación de la agregación plaquetaria (Vane y cols., 1998; Smith y Langenbach, 2001). Además, desempeñan un papel clave en la regulación del tono vascular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Wright y cols., 2001). La hidrólisis de fosfolípidos de membrana por la PLA₂ para liberar AA es el paso limitante en la síntesis de prostanoides. La prostaglandina (PG) endoperóxido H sintasa (PGHS), llamada también ciclooxigenasa (COX), es la enzima reguladora de la síntesis de prostanoides. La COX posee dos actividades catalíticas, una ciclooxigenasa, que incorpora dos moléculas de O₂ al AA para dar PGG₂, y otra peroxidasa, que cataliza la reducción de PGG₂ a PGH₂, la cual, por acción de sintasas específicas, da lugar a los distintos prostanoides (Davidge, 2001) (Fig 5). La producción de cada uno de los prostanoides dependerá de las sintasas que existan en cada tipo celular. Así, en las plaquetas se produce principalmente TXA₂ mediante la tromboxano sintasa, que causa agregación plaquetaria, vasoconstricción y proliferación de las células musculares lisas, mientras que en el endotelio es la prostaciclina el principal prostanoide sintetizado, que causa vasodilatación, además de ser un potente antiagregante plaquetario. La disponibilidad de AA y la actividad de la COX son puntos clave en la producción de las prostaglandinas. Los isoprostanos son esteroisómeros de las prostaglandinas que no requieren COX para su síntesis, ya que se forman por peroxidación directa no enzimática del AA por radicales libres (Morrow y Roberts, 1997). Existe una relación entre el daño tisular provocado por los radicales libres y la síntesis de isoprostanos, productos que tienen un potente efecto vasoconstrictor, lo que hace pensar que no sean simples marcadores de peroxidación lipídica, sino que posean actividades específicas.

Los prostanoides son liberados de las células que los sintetizan a través de transportadores y ejercen sus efectos por unión a receptores acoplados a proteínas G específicos (Wright y cols., 2001). Así, nos encontramos con ocho receptores diferentes para los distintos prostanoides: TP es el receptor para el TXA₂, IP para PGI₂, FP para

PGF_{2α}, DP para PGD₂ y para PGE₂ se han caracterizado 4 subtipos de receptores EP (EP₁-EP₄). Todos estos receptores se han clasificado en tres grupos en base a su homología y a las propiedades atribuidas: 1) IP, DP, EP₂ y EP₄ están acoplados a proteínas Gs y conforman el grupo de receptores cuya activación provoca relajación muscular mediante incremento de AMPc por estimulación de la adenilato ciclasa (AC); 2) EP₁, FP y TP son receptores acoplados a proteínas Gq y van a mediar la activación de la PLC, lo que conlleva la liberación de Ca²⁺ de las reservas intracelulares, activación de la PKC y contracción; 3) el receptor EP₃ está acoplado a proteína Gi y su activación inhibe la AC, disminuyendo los niveles de AMPc y provocando vasoconstricción (Wright y cols., 2001) (Fig. 5).

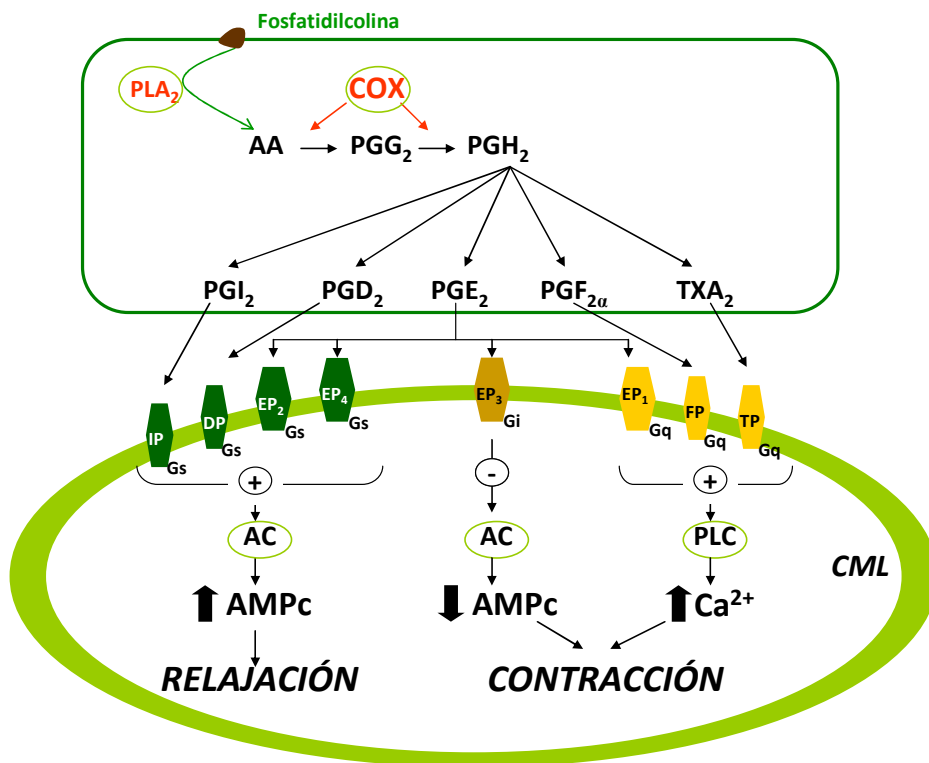


Fig. 5: Síntesis de prostanoideos y mecanismos de señalización tras la activación de sus receptores. AA: ácido araquidónico; AC: adenilato ciclasa; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenasa; DP: receptor de PGD₂; EP: receptor de PGE₂; FP: receptor de PGF_{2α}; IP: receptor de PGI₂; PLA₂: fosfolipasa A₂; PLC: fosfolipasa C; TP: receptor de TXA₂.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre la síntesis de prostanoideos vasodilatadores y vasoconstrictores, especialmente PGI₂ y TXA₂, que participan en la modulación del tono vascular. Sin embargo, en determinadas situaciones patológicas

como por ejemplo hipertensión, diabetes, isquemia cerebral o envejecimiento, se produce un aumento en la formación de prostanoïdes vasoconstrictores (Davidge, 2001).

Se han descrito 3 isoformas de la COX: COX-1, COX-2 y COX-3, siendo COX-1 y COX-2 las mejor conocidas. Tienen un 60-65% de homología de secuencia y un peso molecular aproximado de 70 KDa. COX-1 está implicada en el mantenimiento de la homeostasis celular y, aunque es una proteína que se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos como plaquetas (Smith y Langenbach, 2001), mucosa gástrica (Peskar, 2005), riñones (Khan y cols., 1998) y en la pared vascular (Briones y cols., 2005b), también puede ser inducida por estrés mecánico (Doroudi y cols., 2000), o en el caso del endotelio vascular, por estímulos como el rozamiento del flujo sanguíneo (Andresen y cols., 2006). La expresión de COX-2 se induce en la mayoría de los tejidos, sobre todo por estímulos inflamatorios, aunque también se encuentra expresada constitutivamente en determinadas zonas del cerebro (Andresen y cols., 2006), riñón (Vane y cols., 1998), tejido gastrointestinal (Zimmermann y cols., 1998), así como en células vasculares procedentes de arterias de resistencia (Hernanz y cols., 2003; Briones y cols., 2005a) y de conductancia (Alvarez y cols., 2007). COX-1 presenta una estructura característica de genes *housekeeping* o genes con actividad constitutiva, mientras que COX-2 es un gen de respuesta temprana, lo que hace que, a diferencia de COX-1, presente múltiples sitios de regulación. La expresión de COX-2 se regula por multitud de sustancias como IL-1 β , lipopolisacárido bacteriano (LPS), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interferón- γ (INF- γ) (Tsatsanis y cols., 2006), altas concentraciones de glucosa (Cosentino y cols., 2003), factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Tamura y cols., 2006), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) y el factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β) (Tsatsanis y cols., 2006), o péptidos vasoactivos circulantes como Ang II (Alvarez y cols., 2007; Beltrán y cols., 2009), bradiquinina (El-Haroun y cols., 2004) y endotelina-1 (ET-1) (Peng y cols., 2008). Entre los mecanismos de regulación de la expresión de COX-2 destacan la activación, entre otros, de rutas de señalización dependientes de las MAPK o factores de transcripción redox-sensibles como NF- κ B, proteína activadora-1 (AP-1), proteína de unión a la secuencia *enhancer*

CCAAT (C/EBP) o factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) (Tsatsanis y cols., 2006) (Fig. 6).

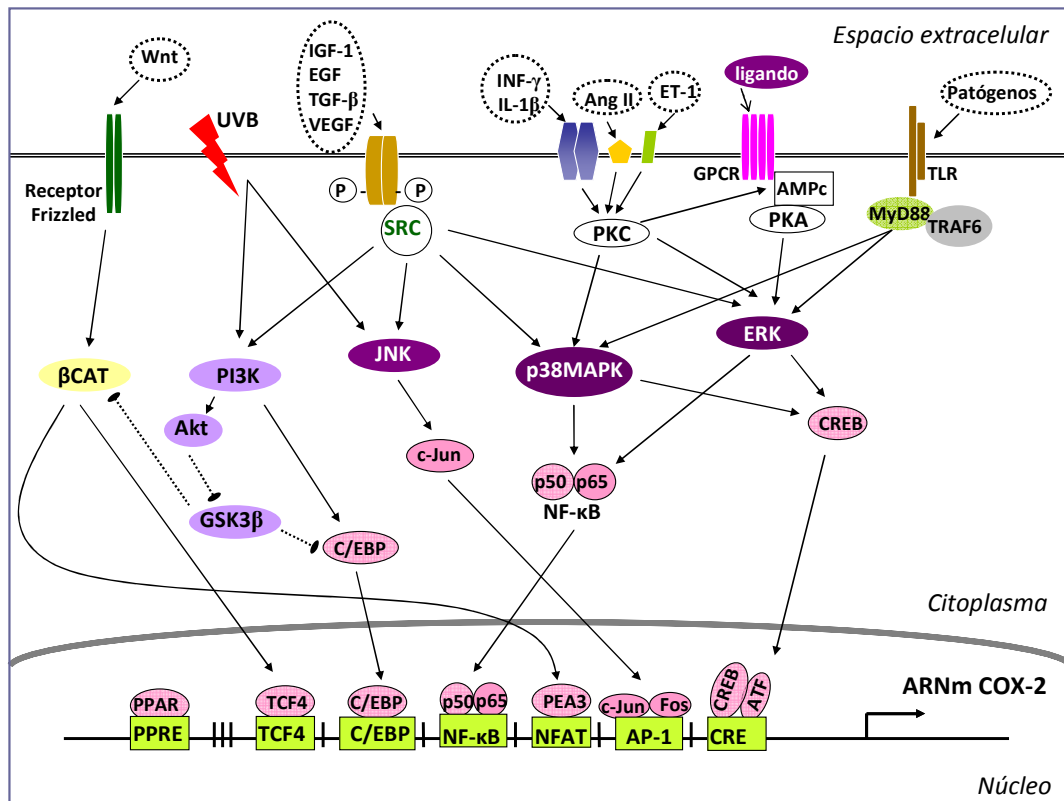


Fig. 6: Esquema mostrando la multitud de rutas de señalización que regulan la expresión de COX-2. AMPc: adenosín monofosfato cíclico; Ang II: angiotensina II; AP-1: proteína activadora-1; ATF: factor de la activación de la transcripción; C/EBP: proteína de unión a la secuencia *enhancer* CCAAT; CRE: elemento de respuesta a AMPc; CREB: proteína de unión a CRE; EGF: factor de crecimiento epidérmico; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; ET-1: endotelina-1; GPCR: receptor acoplado a proteínas G; GSK3β: glucógeno sintasa quinasa 3β; IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1; IL-1β: interleuquina-1β; INF-γ: interferón-γ; JNK: quinasa del extremo N terminal de c-jun; MMP: metaloproteína de matriz; MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide; NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados; NF-κB: factor nuclear activador de la síntesis de la cadena ligera κ de linfocitos B; PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas; PPRE: elemento de respuesta a PPAR; TCF-4: factor de células T-4; TGF-β: factor de crecimiento tumoral-β; TLR: receptor *toll like*; TRAF-6: factor asociado al receptor de TNF-6; UVB: radiación ultravioleta B; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; Wnt: proteína Wingless; β-CAT: β-catenina. Adaptado de Tsatsanis y cols., 2006.

La inducción de la expresión de COX-2 por citoquinas y factores proinflamatorios puede estar vinculada, además, al incremento en el estrés oxidativo. Así, la relación entre el incremento en la producción de ROS, la actividad de la NAD(P)H oxidasa, principal fuente de O_2^- a nivel vascular, y la expresión de COX-2 ha sido descrita en

cardiomiocitos estimulados con LPS (Peng y cols., 2005), en la corteza renal (Jaimes y cols., 2008) o aortas de ratas hipertensas estimuladas con Ang II (Alvarez y cols., 2007). Todo lo anteriormente descrito permite establecer un nexo entre la expresión de esta isoforma con el estado de inflamación asociado a diversas patologías vasculares como hipertensión, diabetes o aterosclerosis, entre otras.

Chandrasekharan y cols. (2002) han descrito una tercera isoforma derivada de COX-1, la COX-3, que se expresa sobre todo en vasos cerebrales (Andresen y cols., 2006). Se ha sugerido que esta isoforma aparecería en etapas tardías del proceso inflamatorio (Willoughby y cols., 2000).

2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ROS son moléculas derivadas de oxígeno que se producen como resultado del metabolismo oxidativo aerobio en prácticamente todas las células, incluyendo las que componen la pared vascular. Entre las ROS encontramos el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) o el $ONOO^{\cdot-}$.

Se caracterizan por presentar electrones desapareados, lo que las dota de alta reactividad y una vida media muy corta, cualidades que hacen que sean segundos mensajeros de gran eficacia y participen en multitud de rutas de señalización celular como las activadas por factores de crecimiento y citoquinas (Simon y cols., 1998; Griendling y cols., 2000). Así, a concentraciones intracelulares moderadas, las ROS son clave en las rutas fisiológicas de señalización celular; sin embargo, un aumento en sus concentraciones podría estar asociado con el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares. De hecho, el papel de las ROS ha ido cobrando cada vez más relevancia debido a su participación en la mayoría de las rutas de señalización intracelular implicadas en el remodelado vascular, los cambios en la reactividad a agentes vasoconstrictores, la hipertrofia de células de la pared del vaso y la inflamación crónica asociada a patologías como la hipertensión (Griendling y cols., 2000; Taniyama y Griendling, 2003; Pauletto y Rattazzi, 2006; Marchesi y cols., 2008; Paravicini y Touyz, 2008; Harrison y Gongora, 2009) (Fig. 7).

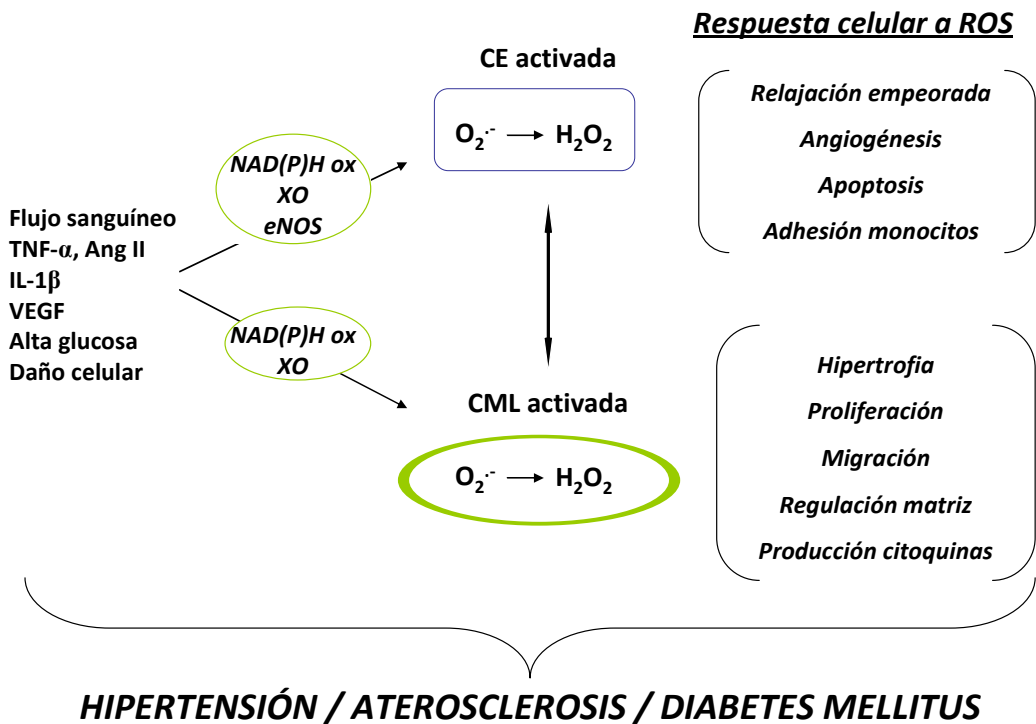


Fig. 7: Modulación de la función celular por ROS en enfermedades cardiovasculares. Diversos estímulos extracelulares producen ROS que activan las células vasculares, alterando la función celular. Estos cambios en el fenotipo contribuyen al inicio y progreso de enfermedades cardiovasculares. *Ang II*: angiotensina II; *CE*: células endoteliales; *CML*: célula muscular lisa; *eNOS*: óxido nítrico sintasa endotelial; *IL-1 β* : interleuquina-1 β ; *NAD(P)H ox*: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; *TNF- α* : factor de necrosis tumoral- α ; *VEGF*: factor de crecimiento endotelial vascular; *XO*: xantina oxidasa. Adaptado de Taniyama y Griendling, 2003.

Estímulos inflamatorios como IL-1 β , TNF- α , LPS o Ang II activan la producción de ROS por distintos mecanismos celulares (Meier y cols., 1989; Rajagopalan y cols., 1996; Bowie y O'Neill, 2000; Mendes y cols., 2003; Manea y cols., 2010; Briones y cols., 2011). En última instancia, el incremento en la producción de ROS da lugar a la activación de factores de transcripción proinflamatorios como NF- κ B y AP-1 (Bowie y O'Neill, 2000; Mendes y cols., 2003; Grau y cols., 2004; Lu y Wahl, 2005; Paravicini y Touyz, 2006), y de MAPKs como JNK, p38 o ERK 1/2 (Lo y cols., 1996; LaPointe e Isenović, 1999), la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (STAT) (Simon y cols., 1998) o el factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1) (Sánchez-López y cols., 2005), además de la expresión de genes proinflamatorios como la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) (Marui y cols., 1993; Costanzo y cols., 2003), COX-2 (Alvarez y cols., 2005; Jaimes y cols., 2005), VEGF (Chua y cols., 1998) y la proteína

quimioattractiva de monocitos (MCP-1) (Chen y cols., 1998), entre otras, regulando de ese modo la migración y la proliferación celular.

Además de su efecto proinflamatorio, las ROS también participan en la regulación del tono vascular (Zalba y cols., 2000), aunque sus efectos son dependientes de la concentración, lecho vascular, especie reactiva y condiciones experimentales, debido probablemente a la diversidad de moléculas de señalización involucradas en la regulación del tono.

Debido a la alta actividad celular inducida por las ROS, se requiere un fino equilibrio en sus niveles, lo que implica la regulación de la expresión y actividad tanto de las enzimas productoras como de los mecanismos enzimáticos que contribuyen a su eliminación (Fig. 8). Estos mecanismos consisten, fundamentalmente, en enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y la tiorredoxina reductasa (Faraci y Didion, 2004; Johnson y Giulivi, 2005).

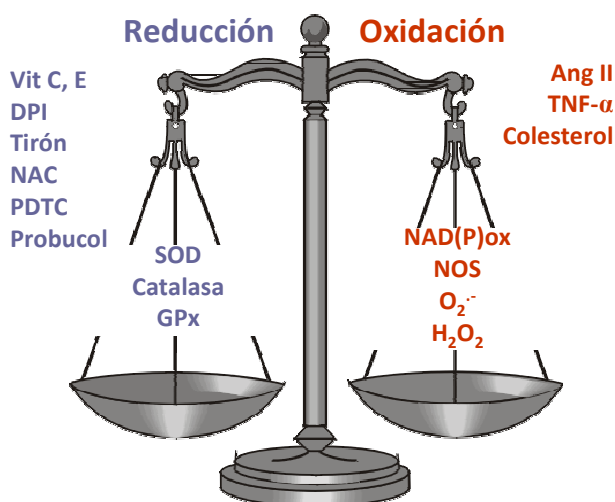


Fig. 8: Balance redox en células vasculares. El estado oxidativo depende del balance entre la producción de oxidantes y las defensas antioxidantes de las células. Estímulos extracelulares como Ang II, TNF- α o hipercolesterolemia pueden modificar el balance hacia un estado proinflamatorio, mientras que la exposición a antioxidantes químicos extracelulares (*DPI*: yoduro de difenileno; *NAC*: N-acetil cisteína; *PDTC*: pirrolidinditiocarbamato; Probucof; Tirón; *Vit C, E*: vitamina C, E) o *upregulación* de enzimas antioxidantes (Catalasa; GPx: glutatión peroxidasa o *SOD*: superóxido dismutasa) producen un ambiente más reducido.

2.3.1. Anión superóxido

El $O_2^{\cdot-}$, que se genera por la adición de un electrón al oxígeno molecular, es un radical no difusible que se reduce rápidamente por las SODs celulares a H_2O_2 , una ROS más estable. Aunque su vida media es muy corta, tiene un importante papel puesto que, además de sus propias funciones, a partir de él derivan el resto de las ROS.

El $O_2^{\cdot-}$ puede ser generado por diversas fuentes como la cadena respiratoria mitocondrial, la lipoxigenasa, el citocromo P450 o la NOS en determinadas condiciones de déficit de sustrato o por déficit u oxidación del cofactor BH_4 (Yoneyama y cols., 2001; Wolin y cols., 2002). Otra fuente de $O_2^{\cdot-}$ es la xantina oxidasa (XO), enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina para formar $O_2^{\cdot-}$. Esta enzima está presente en el endotelio vascular y hay evidencias que sugieren su implicación en la disfunción vascular encontrada en patologías cardiovasculares como hipertensión (Schulz y cols., 2011). También el componente peroxidasa de la reacción de la COX es capaz de catalizar la producción de $O_2^{\cdot-}$ a través de la transferencia secuencial de dos electrones desde el NAD(P)H al oxígeno molecular. Así, COX puede actuar como una fuente significativa de $O_2^{\cdot-}$ generando simultáneamente prostaglandinas (Wolin y cols., 2002). Sin embargo, la principal fuente vascular de $O_2^{\cdot-}$ es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa [NAD(P)H oxidasa], un complejo enzimático descrito inicialmente en macrófagos, donde ejerce funciones microbicidas, pero descrito posteriormente en todos los tipos celulares integrantes de la pared vascular (Touyz y Schiffrin, 2004; Lyle y Griendling, 2006; Paravicini y Touyz, 2008) (Fig. 9).

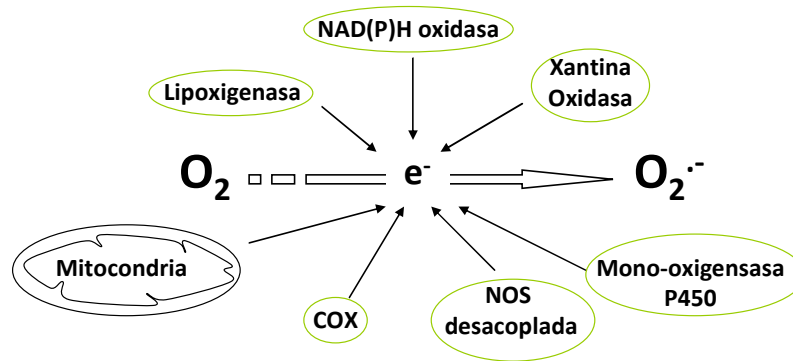


Fig. 9: Principales fuentes enzimáticas responsables de la generación de $O_2^{\cdot-}$. COX: ciclooxigenasa; *NAD(P)H oxidasa*: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NOS: óxido nítrico sintasa. Adaptado de Paravicini y Touyz, 2008.

La *NAD(P)H oxidasa* está formada por cinco subunidades, tres subunidades citosólicas p47phox, p67phox y Rac y dos subunidades transmembrana, p22phox y gp91phox o NOX-2. En células no estimuladas, NOX-2, subunidad catalítica de la *NAD(P)H oxidasa*, y p22phox se encuentran unidas formando una flavoproteína heterodimérica, el citocromo b_{558} . Tras la estimulación por agonistas, p47phox es fosforilada y translocada a la membrana donde se va a unir a p22phox. Entonces p67phox se une a la subunidad p47phox, proporcionando un sitio de unión para la proteína Rac-1, efector último de la generación de $O_2^{\cdot-}$ (Seshiah y cols., 2002; Lyle y Griendling, 2006) (Fig. 10).

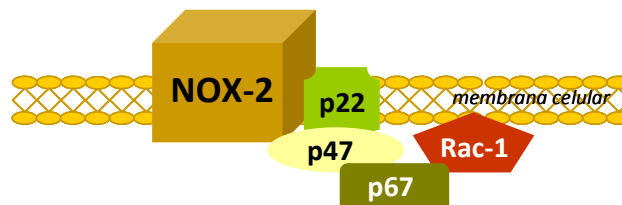


Fig. 10: Esquema representativo de la *NAD(P)H oxidasa* activada.

Actualmente se conoce una familia de *NAD(P)H oxidasas* debido al descubrimiento de homólogos de la subunidad catalítica gp91phox o NOX-2, que son designados como la familia NOX. Hasta la fecha se han descrito 7 subunidades: NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX-5, DUOX-1 y DUOX-2 (Griendling, 2004). De éstas, son las subunidades NOX-1, NOX-2, NOX-4 y NOX-5 las que se expresan a nivel vascular. NOX-1, NOX-2 y NOX-4 están predominantemente expresadas en CMLV, células endoteliales y fibroblastos y NOX-5, sólo encontrada en humanos, se expresa mayoritariamente en CMLV de vasos de conductancia y células endoteliales (Griendling, 2004).

La activación de la NAD(P)H oxidasa tiene lugar por multitud de estímulos que van desde el estrés mecánico a factores de crecimiento como TGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o EGF, o citoquinas como TNF- α o IL-1 β . También se activa por agonistas de receptores acoplados a proteínas G como serotonina, trombina, bradiquinina, ET-1 y Ang II y por factores metabólicos como la hiperglucemia o hiperinsulinemia (Paravicini y Touyz, 2008). Los mecanismos de regulación y las vías de señalización para su activación son diferentes dependiendo de la subunidad NOX, del lecho vascular, del tipo celular y del estímulo de que se trate. Con tal diversidad en su distribución y mecanismos de regulación, no sorprende que las NAD(P)H oxidasas con diferentes homólogos de NOX tengan funciones distintas.

Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ celulares dependen tanto de su tasa de producción como de su velocidad de eliminación por enzimas como las SODs. Existe, por lo tanto, una íntima asociación entre los niveles de expresión de las SODs y los niveles de $O_2^{\cdot-}$, otorgando a las SODs un papel fundamental en las respuestas vasculares al estrés oxidativo (Wassmann y cols., 2004; Johnson y Giulivi, 2005). En mamíferos existen tres isoformas descritas de SODs que son codificadas por genes distintos y cuyo centro catalítico está formado por un metal. Presentan distinta localización celular, lo que sugiere que su actividad es específica del compartimento donde llevan a cabo la reacción enzimática. Todas las SODs catalizan la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y oxígeno molecular (Cai, 2005). La manganeso-SOD (Mn-SOD) se encuentra en la mitocondria y se encarga de dismutar el $O_2^{\cdot-}$ formado por la actividad de la cadena respiratoria; la cobre/zinc-SOD (Cu/Zn-SOD) se encuentra en el citosol, núcleo y peroxisomas y transforma el $O_2^{\cdot-}$ generado por las oxidasas citosólicas como la NAD(P)H oxidasa; y la extracelular-SOD (EC-SOD), única isoforma expresada extracelularmente, se une a la membrana celular a través de un dominio de unión a heparina (Fig. 11). Esta última parece jugar un papel en la regulación de la presión arterial y la contractilidad vascular, al menos en parte, por modular la función endotelial controlando los niveles de $O_2^{\cdot-}$ extracelulares y, así, la biodisponibilidad de NO (Faraci y Didion, 2004).

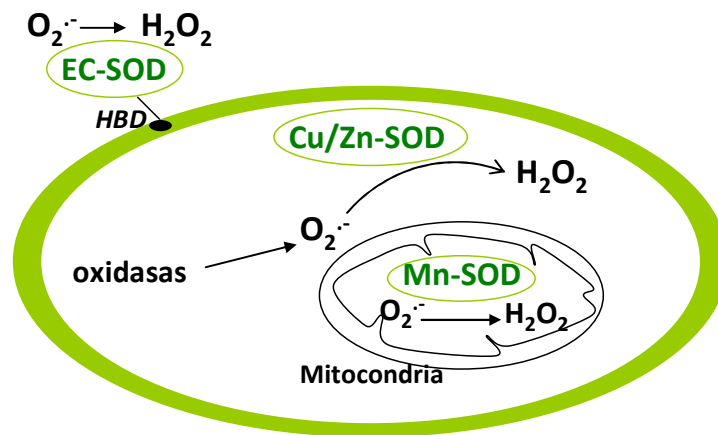


Fig. 11: Localización subcelular de las tres isoformas de la SOD. Cu/Zn-SOD localizada principalmente en el citosol, Mn-SOD en la mitocondria y la EC-SOD en el espacio extracelular. HBD: dominio de unión a heparina. Adaptado de Faraci y Didion, 2004.

El $O_2^{\cdot-}$ participa en la regulación del crecimiento celular, en los mecanismos de defensa de fagocitos y juega un papel clave en la biología vascular, lo que hace que sea una diana a considerar en patologías donde sus niveles son elevados como en la hipertensión, la aterosclerosis o la diabetes. A nivel vascular induce apoptosis, expresión de moléculas de adhesión o angiogénesis en células endoteliales; en CML induce crecimiento, migración celular, reorganización de la matriz extracelular y expresión de genes inflamatorios a través de la activación de proteínas implicadas en el remodelado vascular como metaloproteasas de matriz (MMPs) o de rutas de señalización celular implicadas en el estrés oxidativo como MAPKs o factores de transcripción sensibles al estado redox celular como NF- κ B o AP-1, entre otros (Bowie y O'Neill, 2000; Taniyama y Griendling, 2003; Paravicini y Touyz, 2006). Además, el $O_2^{\cdot-}$ tiene propiedades vasoactivas *per se* ya que produce efectos vasoconstrictores en muchos lechos vasculares (Hernanz y cols., 2003; Ishihara y cols., 2008), participa en las respuestas vasoconstrictoras de otros agonistas y disminuye relajaciones endotelio-dependientes (Yang y cols., 2002; Wiggers y cols., 2008). Aunque se ha descrito que la inhibición de la apertura de canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) y canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V) por $O_2^{\cdot-}$ provoca despolarización y contracción del músculo liso (Gutterman y cols., 2005), el principal mecanismo por el que $O_2^{\cdot-}$ produce estos efectos es reduciendo la biodisponibilidad del NO al interactuar con él para formar $ONOO^{\cdot-}$, radical que a su vez es capaz de producir vasoconstricción en algunos lechos vasculares (Bachschnid y cols., 2003; Schildknecht y Ullrich, 2009). Sin embargo, a

pesar de la implicación del $O_2^{\cdot-}$ en la vasoconstricción, también existen estudios que demuestran que esta especie reactiva de oxígeno es capaz de producir vasodilatación a través de la formación de $ONOO^-$, que va a estimular la GCs, y de la formación de un factor relajante de naturaleza desconocida que abre canales de K^+ sensibles a glibenclamida (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995).

2.3.2. Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno altamente estable y permeable a las membranas celulares, que se genera mayoritariamente por dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ en una reacción catalizada por la SOD. Además, el H_2O_2 puede ser generado directamente por enzimas celulares como la XO, la glucosa oxidasa o la NAD(P)H oxidasa (Lacy y cols., 1998; Dikalov y cols., 2008) a través de la transferencia consecutiva de dos electrones al oxígeno molecular (Cai, 2005). También se ha descrito la producción basal de H_2O_2 por acción de la eNOS y nNOS en caso de déficit de sustrato o cofactor (Heinzel y cols., 1992); esta producción de H_2O_2 no depende de la formación previa de $O_2^{\cdot-}$, puesto que la SOD no modifica dicha producción (Heinzel y cols., 1992). Por otra parte, H_2O_2 puede activar a la NAD(P)H oxidasa e incrementar así la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Li y cols., 2001; Seshiah y cols., 2002; García-Redondo y cols., 2009b).

Los niveles de H_2O_2 en el tejido vascular son finamente regulados por sus sequestradores endógenos, la catalasa y la GPx (Wassmann y cols., 2004). La catalasa es una enzima localizada principalmente en los peroxisomas, aunque su expresión es detectable en el citoplasma. Esta enzima cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y dos moléculas de oxígeno (Cai, 2005) con una eficacia muy alta en situaciones de elevado estrés oxidativo, protegiendo a la célula del H_2O_2 intracelular y, por lo tanto, de forma indirecta, del $O_2^{\cdot-}$ (Wassmann y cols., 2004). La GPx se encuentra en el citosol celular y en la mitocondria y es una enzima clave para la defensa celular contra el estrés oxidativo (Fig. 12).

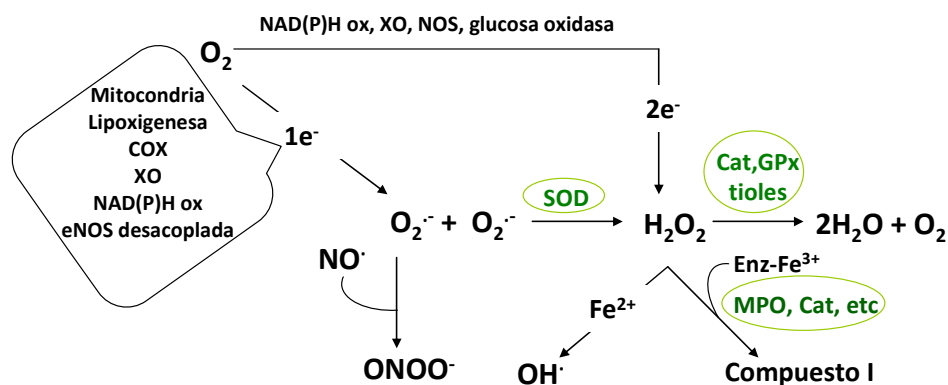


Fig. 12: Generación y metabolismo del H_2O_2 . El oxígeno molecular (O_2) forma $\text{O}_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 , por adición de 1 ó 2 electrones, respectivamente. Sin embargo, la mayoría del peróxido bioactivo deriva de la reacción catalizada por la SOD a partir del $\text{O}_2^{\cdot-}$. La degradación de H_2O_2 es llevada a cabo por catalasa (Cat), glutatión peroxidasa (GPx) o pequeñas moléculas como tioles. H_2O_2 también puede ser precursor del OH^{\cdot} o compuesto I (producto de la oxidación de enzimas que contienen Fe^{3+} , como las mieloperoxidasas, MPO). COX: ciclooxigenasa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; NAD(P)H ox: nicotinamida adenina dinucleótido fostafo oxidasa; SOD: superóxido dismutasa; XO: xantina oxidasa. Adaptado de Cai, 2005.

Al igual que el $\text{O}_2^{\cdot-}$, la producción de H_2O_2 está asociada a muchas patologías cardiovasculares por activar factores de transcripción como AP-1 o NF- κ B que regulan la expresión de genes implicados en la inflamación, la proliferación celular y el propio incremento del estrés oxidativo (Barchowsky y cols., 1995; Mendes y cols., 2003). Entre las funciones llevadas a cabo por el H_2O_2 cabe destacar que es un factor clave en la activación de p38MAPK, JNK y proteína quinasa activada por señales extracelulares (ERK) (Guyton y cols., 1996), lo que sitúa a esta ROS como importante mediadora de los efectos observados en respuesta a estímulos como Ang II (Griendling y cols., 2000; Dikalov y cols., 2008). Además, el H_2O_2 contribuye al aumento en la permeabilidad vascular (Siflinger-Birnboim y cols., 1992), regula la expresión de citoquinas como IL-8 (De Oliveira-Marques y cols., 2007), TNF- α (Nakao y cols., 2008), moléculas de adhesión como VCAM-1 (Lee y cols., 2008) o la molécula de adhesión celular inducible-1 (ICAM-1) (Lo y cols., 1993) y de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Nakamura y Sakamoto, 2001; Jaimes y cols., 2005; Lu y Wahl, 2005; Cao y cols., 2006).

A nivel vascular, el H_2O_2 es un importante modulador de la respuesta fisiológica vascular, habiendo sido identificado en algunos lechos vasculares como el EDHF (Matoba y cols., 2000; Yada y cols., 2003). Se ha descrito que H_2O_2 induce vasodilatación en arterias pulmonares (Burke y Wolin, 1987), coronarias (Sato y cols.,

2003) y mesentéricas (Matoba y cols., 2000; Gao y cols., 2003). En este caso, la acción de las SODs tendría como consecuencia el intercambio enzimático de una ROS implicada en el aumento de las respuestas vasoconstrictoras por otra asociada con un aumento en las relajaciones dependientes de endotelio (Shimokawa y Morikawa, 2005). Sin embargo, sus acciones vasculares son dependientes del lecho vascular analizado, ya que el H_2O_2 también puede provocar vasoconstricción (Rodríguez-Martínez y cols., 1998; Hernanz y cols., 2003) o una respuesta bifásica, caracterizada por una fase contráctil seguida de relajación (Gao y cols., 2003; García-Redondo y cols., 2009b). En arterias de resistencia H_2O_2 origina esta respuesta bifásica, estando el componente vasoconstrictor relacionado con un incremento en la producción de O_2^- inducido por el propio H_2O_2 (García-Redondo y cols., 2009b). Brakemeier y cols. (2003), en arterial renal, explican la capacidad del H_2O_2 para inducir contracción por inhibición de K_{Ca} o relajación por activación de los mismos.

2.3.3. Radical hidroxilo

El radical OH^\cdot se genera a partir del H_2O_2 en una reacción catalizada por iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^+) (Cai, 2005) (Fig. 12) o por la degradación del $ONOO^-$ (Darley-Usmar y Halliwell, 1996). Este radical es extremadamente reactivo pero no es difusible, por lo que causa daño local allí donde es generado. Debido a su fuerte reactividad con diversas biomoléculas, es considerada una de las especies más reactivas y perjudiciales. El OH^\cdot puede inducir contracción por mecanismos dependientes de PKC, fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), proteínas tirosín quinasa y MAPK (Li y cols., 2004), así como mediar vasodilatación activando la GCs (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995).

2.3.4. Peroxinitrito

Puesto que el O_2^- tiene mayor afinidad por el NO que las SODs, cuando ambos se producen en sitios cercanos interaccionan para formar un potente oxidante altamente reactivo y tóxico, el $ONOO^-$ (Cai, 2005), que puede producir efectos adversos en la viabilidad y funcionalidad de las células.

La estabilidad que presenta el ONOO^- a pH fisiológico le permite difundir a través de las membranas celulares hasta encontrar sus dianas. Entre los mecanismos por los que causa toxicidad se encuentran la ruptura del ADN, la oxidación de proteínas y lípidos, oxidación de lipoproteínas de baja densidad, fenómenos de toxicidad celular directa, nitración de gran cantidad de proteínas y la oxidación de cofactores como BH_4 , lo que genera un desacoplamiento de la eNOS (Münzel y cols., 2005). Además, puede inhibir la GCs (Münzel y cols., 2005) y promover estrés oxidativo por inhibir la SOD (Félétou y Vanhoutte, 2006). Por otra parte, en presencia de compuestos como los tioles, el ONOO^- puede comportarse como donador endógeno de NO (Moro y cols., 1994; Belik y cols., 2004), el cual puede inducir relajación e inhibir la adhesión y agregación plaquetaria. Asimismo, puede mediar vasoconstricción por diversos mecanismos como son la inactivación por nitración de un residuo de tirosina de la PGI_2 sintasa y la consecuente reducción de los niveles de prostaciclina (Bachschmid y cols., 2003; Schildknecht y Ullrich, 2009), por un mecanismo dependiente de la activación del receptor TP a través de la generación de 8-isoprostanos (Belik y cols., 2004), por inhibir la actividad de eNOS o por disminuir la actividad de los canales K_{Ca} y K_{v} (Gutterman y cols., 2005).

También se ha observado que el ONOO^- juega un importante papel en la respuesta inflamatoria. Por un lado, el ONOO^- tiene funciones proinflamatorias por inducir la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1, p-selectina) en células endoteliales y, por otro lado, posee funciones antiinflamatorias, sobre todo en las últimas fases de la inflamación, mediante inactivación de la COX-2 y nitrosilación de lípidos, lo que facilita la finalización del proceso inflamatorio (Belik y cols., 2004).

2.4. OTROS MEDIADORES

2.4.1. Sistema renina-angiotensina

Además del importante papel en la regulación de la presión sanguínea y en la homeostasis de los líquidos corporales, el SRA participa en la modulación del tono vascular *per se* regulando la liberación de algunos de los factores vasoactivos anteriormente mencionados (Mehta y Griendling, 2007). El incremento tanto en los

niveles como en el grado de activación de los integrantes de este sistema se ha asociado con el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares como la aterosclerosis (Hammoud y cols., 2007), la diabetes (McGuire y cols., 2008) y la hipertensión (Ruiz-Ortega y cols., 2006; Kobori y cols., 2007). La Ang II se sintetiza por acción de la renina, enzima proteolítica que actúa sobre el angiotensinógeno dando lugar a angiotensina I (Ang I), que a su vez se convierte en Ang II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Mehta y Griendling, 2007) (Fig. 13). Todos los componentes de este sistema se encuentran en la pared vascular.

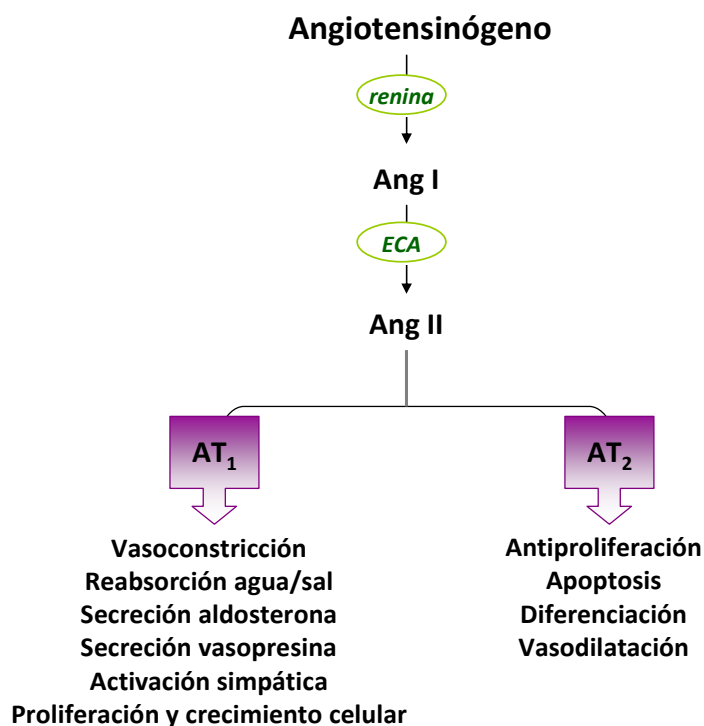


Fig. 13: Cascada bioenzimática del sistema renina-angiotensina y diferentes efectos de angiotensina II mediados por los receptores AT₁ y AT₂. ECA: enzima convertidora de angiotensina.

La Ang II induce secreción de vasopresina y aldosterona, modula la ingesta de agua y la excreción de Na⁺ y H₂O, incrementa la actividad del sistema nervioso simpático y produce vasoconstricción uniéndose a receptores específicos anclados en la membrana plasmática celular (Fig. 13) (Kobori y cols., 2007). Además, en los últimos años se ha demostrado que la Ang II es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en la pared vascular, participando así en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o la hipertensión arterial (Ruiz-Ortega y cols., 2006; Hammoud y cols.,

2007). En este sentido se ha descrito que la Ang II presenta propiedades proinflamatorias que incluyen la producción de ROS (Beltrán y cols., 2009), citoquinas proinflamatorias (Sanz-Rosa y cols., 2005), moléculas de adhesión (Jiang y cols., 2004) y prostanoïdes derivados de COX-2 (Alvarez y cols., 2007).

Existen dos tipos de receptores para la angiotensina, AT₁ y AT₂ (Mehta y Griendling, 2007). A nivel vascular los receptores AT₁ se encuentran predominantemente en las CML, siendo los que median la mayoría de las acciones hipertensivas y proinflamatorias ejercidas por la Ang II (Fig. 13) (Touyz y Schiffrin, 2000; Mehta y Griendling, 2007). Los receptores AT₂ están presentes en tejidos fetales pero su presencia disminuye después del nacimiento, lo que sugiere un importante papel de estos receptores en el desarrollo; además, su expresión es detectable en órganos reproductores, páncreas, riñón, cerebro, corazón y, al igual que los AT₁, en la pared vascular (Touyz y Schiffrin, 2000). La activación de los receptores AT₂ por Ang II da lugar a respuestas vasodilatadoras, apoptosis, diferenciación y efectos antiproliferativos (Fig. 13) (Mehta y Griendling, 2007).

2.4.2. Factor hiperpolarizante derivado de endotelio

Por definición, el EDHF es una sustancia sintetizada y liberada por el endotelio que hiperpolariza a las CML produciendo relajación, y cuya participación en la respuesta vascular se atribuye a aquella respuesta relajante que permanece tras inhibir la síntesis de PGI₂ y de NO (Mombouli y Vanhoutte, 1997). La respuesta mediada por este factor puede ser inducida por diversos agonistas como la bradiquinina, la acetilcolina, la histamina o la sustancia P (Garland y cols., 1995). La naturaleza química del EDHF aún no se conoce, habiéndose sugerido que puede tratarse de un derivado del ácido araquidónico como es el ácido epoxieicosatrienoico (EET) o hidroxieicosatetraenoico (HETE), sintetizados por la epoxigenasa y la lipoxigenasa, respectivamente. Otro posible candidato que podría actuar como EDHF es el H₂O₂ (Shimokawa y Morikawa, 2005) (Fig. 14).

Parece ser que las respuestas mediadas por EDHF se inician con un incremento en la concentración de Ca²⁺ endotelial y la consecuente activación de los canales de K_{Ca}, lo

que origina la liberación de iones K^+ desde el endotelio que hiperpolarizan las CML, bien por comunicación eléctrica a través de uniones *gap* mioendoteliales o bien por acumulación de iones K^+ en el espacio intercelular que origina apertura de canales de K^+ o activación de la Na^+/K^+ -ATPasa (Shimokawa y Morikawa, 2005).

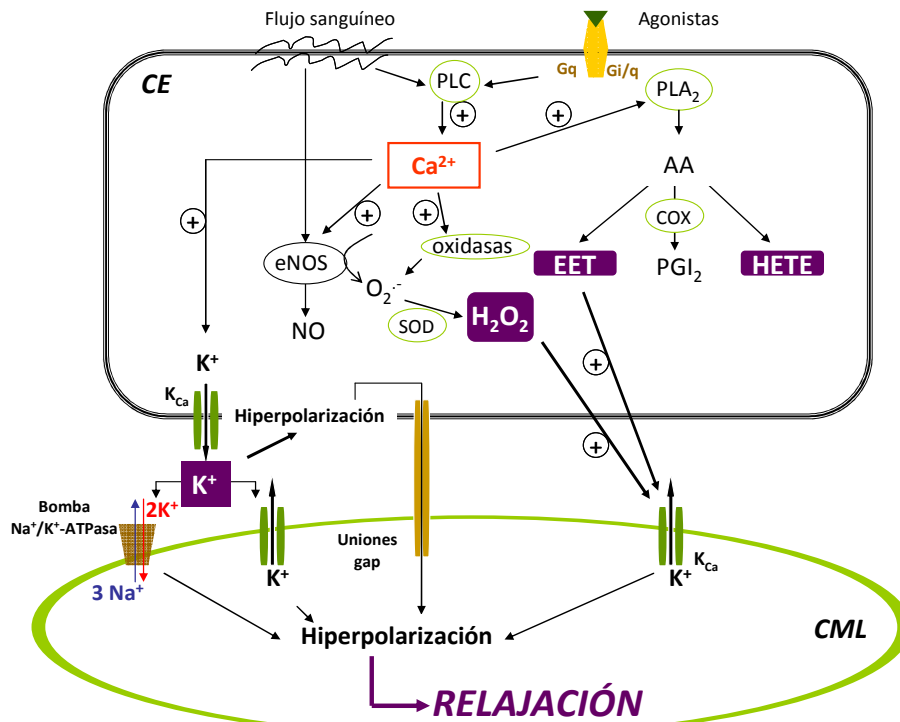


Fig. 14: Hipótesis de la naturaleza de EDHF. Estimulación con agonistas o con el rozamiento del flujo sanguíneo activan la liberación de Ca^{2+} y de ácido araquidónico (AA). Además, el Ca^{2+} puede activar las oxidasas generando O_2^- , que será dismutado por las SODs celulares a H_2O_2 . EDHF también puede hiperpolarizar el músculo liso vascular por la apertura de canales de K^+ provocando vasodilatación. Los principales candidatos EDHF incluyen: ácido epoxieicosatrienoico (EET), ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE), iones K^+ liberados desde el endotelio a través de K_{Ca} que activan la Na^+/K^+ -ATPasa del músculo liso vascular, comunicación eléctrica a través de las *gap junctions* mioendoteliales y el H_2O_2 . CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenasa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; PLA₂: fosfolipasa A₂; PLC: fosfolipasa C; SOD: superóxido dismutasa. Adaptado de Shimokawa y Morikawa, 2005.

2.4.3. Endotelina

Las ETs son una familia de péptidos integrada por ET-1, ET-2 y ET-3, siendo la ET-1 la más abundante a nivel vascular y la más relevante biológicamente. Las ETs se encuentran en una gran variedad de células y tejidos, con diferentes niveles de expresión, donde actúan como moduladores del tono vasomotor y de la presión

sanguínea así como de la proliferación celular (Yanagisawa y cols., 1988; Schiffrin, 2005). Su ARNm codifica para una proteína de 203 aminoácidos, la pre-proendotelina, que a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa, se transforma en una proteína de 39 aminoácidos, la proendotelina. Posteriormente sufre una ruptura por acción, fundamentalmente, de la enzima convertidora de endotelina (ECE) transformándola en ET-1, de 21 aminoácidos, que es el péptido activo. En condiciones fisiológicas, ET-1 es producida en pequeñas cantidades en células endoteliales donde actúa como mediador autocrino/paracrino. Sin embargo, en condiciones patofisiológicas la producción es estimulada en diferentes tipos celulares, incluyendo células endoteliales, CMLV, miocitos cardiacos y células inflamatorias como macrófagos y leucocitos (Böhm y Pernow, 2007).

La endotelina media sus efectos a través de su unión a dos subtipos de receptores, ET_A y ET_B, pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Los receptores ET_A se encuentran en las CMLV mientras que ET_B se encuentran principalmente en las células endoteliales y, en menor proporción, en las células de la musculatura lisa (Böhm y Pernow, 2007). ET-1 puede dar lugar a una respuesta vasoconstrictora, mediada tanto por ET_A como por ET_B de las CML, que se produce por activación de la PLC, o producir vasodilatación mediada por su interacción con los receptores ET_B endoteliales, que al ser estimulados liberan PGI₂, EDHF y NO (Schiffrin, 2005; Böhm y Pernow, 2007).

En condiciones fisiológicas el balance de los factores liberados por los vasos es favorable a la relajación, ya que las células producen bajos niveles de ET-1 y se mantiene la biodisponibilidad del NO. Sin embargo, en ciertas patologías cardiovasculares como aterosclerosis o hipertensión hay un aumento de la producción de ET-1 en macrófagos, células endoteliales y CML, además de un incremento en la expresión de receptores ET_B en las CML cuya estimulación, como hemos comentado, produce vasoconstricción. Por otra parte, en estas patologías los niveles de NO disminuyen, bien por inhibición de la eNOS por ET-1 o por su interacción con el O₂⁻ formado tras activación de los receptores ET_A y/o ET_B de las CML. Todo esto hace que en condiciones patológicas el equilibrio de los factores liberados por los vasos tienda

hacia una mayor vasoconstricción, inflamación y estrés oxidativo (Böhm y Pernow, 2007), que puede estar implicado en la disfunción endotelial (Fig. 15).

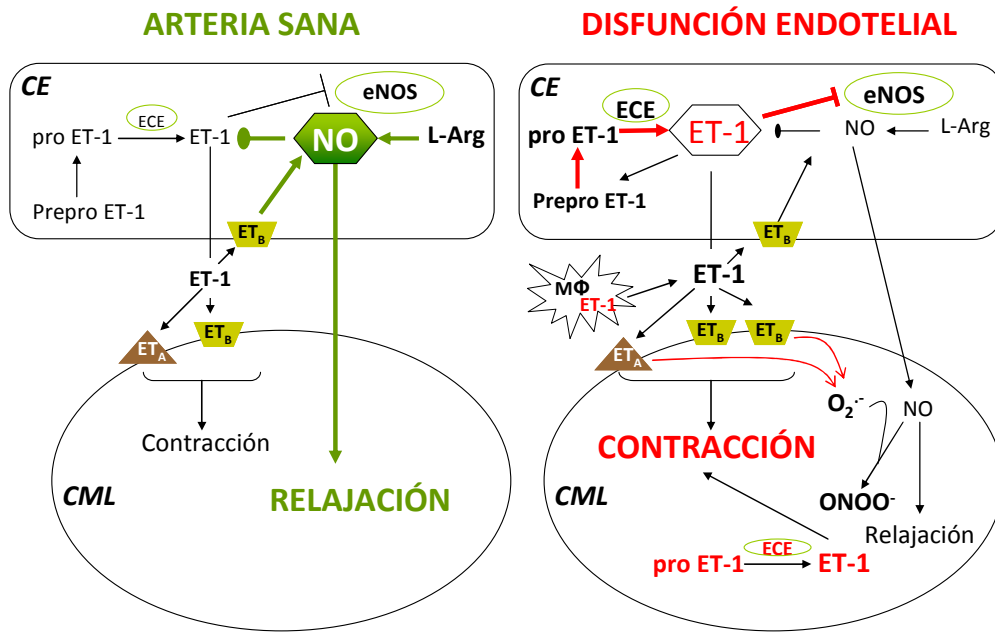


Fig. 15: Figura esquemática de la pared arterial en condiciones sanas (izquierda) y con disfunción endotelial (derecha). En arterias sanas la producción de ET-1 es baja y la biodisponibilidad de NO está preservada, lo que favorece la vasodilatación. En situaciones de disfunción endotelial hay una producción mayor de ET-1 en CE, CML, y macrófagos (Mφ), además de disminuir la producción de NO. Hay también incrementada expresión de receptores ET_B en músculo liso vascular, que media vasoconstricción, así como aumentada formación de O₂⁻ por acción sobre ET_A y ET_B, reduciéndose la biodisponibilidad del NO por formar ONOO⁻. El balance de efectos cambia hacia la vasoconstricción, inflamación y estrés oxidativo en disfunción endotelial. CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; ECE: enzima convertidora de endotelina; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial. Adaptado de Böhm y Pernow, 2007.

2.4.4. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas solubles o péptidos grandes producidos por distintos tipos celulares, que actúan como comunicadores químicos entre células. En situaciones fisiológicas se encuentran a concentraciones muy bajas, pero ante un estímulo inflamatorio sus niveles pueden incrementarse notablemente. Existen citoquinas antiinflamatorias como TGF-β, IL-4, IL-10 e IL-13 y citoquinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1 e IL-6. Las citoquinas proinflamatorias pueden inducir la expresión de proteínas que sintetizan otros péptidos de la misma familia o enzimas como la iNOS y la COX-2 y diversos mediadores como ET-1, ROS o prostanoïdes, afectando a la función vascular (Vila y Salaices, 2005) (Fig. 16). La respuesta vascular parece estar determinada

por el equilibrio entre todos estos factores. El hecho de que las citoquinas se hayan encontrado elevadas en muchas patologías cardiovasculares donde también se ha observado disfunción endotelial apoya la relación entre inflamación y enfermedades cardiovasculares (Huang y Vita, 2006).

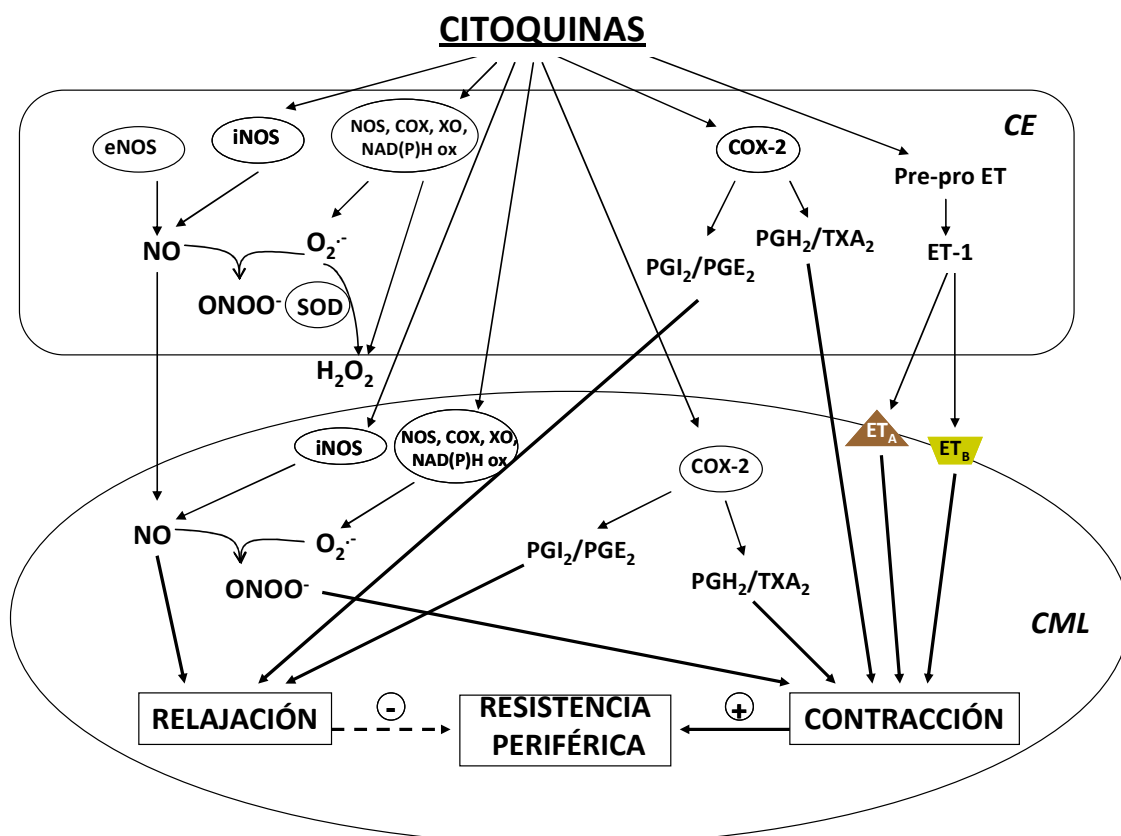


Fig. 16: Mecanismos implicados en los efectos de las citoquinas sobre la reactividad vascular. CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; COX-2: ciclooxigenasa-2; NAD(P)H ox: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NOS: óxido nítrico sintasa; SOD: superóxido dismutasa; XO: xantina oxidasa. Adaptado de Vila y Salaices, 2005.

3. LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La hipertensión arterial es una patología multifactorial que se caracteriza por un incremento de la resistencia vascular periférica y de la presión arterial, y por los daños cardiovasculares y renales asociados a su desarrollo. Actualmente representa uno de los principales problemas de salud en los países desarrollados. En España, por ejemplo, la hipertensión arterial afecta al 35% de los sujetos adultos, de ahí la importancia de conocer la fisiopatología de la hipertensión y desarrollar terapias adecuadas para su tratamiento. El Séptimo Informe del *Joint National Committee sobre Prevención*,

Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC 7; Chobanian y cols., 2003) ha definido como hipertensión, en la población adulta, cuando se detectan cifras mantenidas de presión arterial diastólica superiores a 90 mmHg y presión arterial sistólica superiores a 140 mmHg. Además, define un estado prehipertensivo cuando los valores de presión arterial oscilan entre 120/80 mmHg y 139/89 mmHg, ya que se incrementan las probabilidades de que estos sujetos tengan eventos cardiovasculares además de un alto riesgo de desarrollar hipertensión. La hipertensión provoca alteraciones vasculares estructurales, mecánicas y funcionales que contribuyen a las complicaciones vasculares e incremento de riesgo cardiovascular en patologías como el infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca o infarto cerebral (Marchesi y cols., 2008; Mulvany, 2008).

La hipertensión arterial se clasifica en primaria o esencial y secundaria. La hipertensión arterial esencial representa entre el 90-95% de los casos y aunque se sabe que factores genéticos, ambientales o la dieta juegan un papel importante en su desarrollo, se desconoce la causa de la misma (Carretero y Oparil, 2000). La hipertensión arterial secundaria representa entre el 5-10% de los casos y puede ser provocada, entre otras causas, por daños renales, renovasculares, endocrinos como el hiperaldosteronismo o hipertiroidismo, la hipertensión durante el embarazo o la hipertensión por coartación de la aorta (Akpunonu y cols., 1996).

3.1. LA HIPERTENSIÓN COMO ENFERMEDAD INFLAMATORIA

En los últimos años se ha descrito que un estado inflamatorio crónico puede ser el responsable de las alteraciones vasculares que aparecen en la patología hipertensiva (Savoia y Schiffrin, 2006; Marchesi y cols., 2008). En pacientes con hipertensión arterial se ha observado que la reacción inflamatoria implica complejos procesos de interacción entre células inflamatorias como los neutrófilos, linfocitos o macrófagos y las células vasculares, las cuales van a responder incrementando la expresión de moléculas de adhesión (integrinas, selectinas, ICAM-1, VCAM-1), citoquinas (TNF- α , IL-6), quimioquinas (MCP-1) y factores de crecimiento, lo que conlleva a la infiltración de esas células inflamatorias en la pared vascular y en determinados órganos como el riñón, corazón y cerebro (Pauletto y Rattazzi, 2006). En modelos animales también se ha

descrito la existencia de niveles elevados de citoquinas circulantes como IL-1 β , IL-6 o TNF- α (Sanz-Rosa y cols., 2005), de mediadores proinflamatorios como Ang II (Ruiz-Ortega y cols., 2006) y ET-1 (Virdis y Schiffrin, 2003), así como una elevada expresión y actividad de enzimas proinflamatorias como las isoformas inducibles COX-2 (Adeagbo y cols., 2005; Alvarez y cols., 2005; 2007; Jaimes y cols., 2008) e iNOS (Briones y cols., 2002a; Alvarez y cols., 2008). Asociado a este estado proinflamatorio, se encuentra un incremento en el estrés oxidativo plasmático y vascular (Paravicini y Touyz, 2006; 2008). Entre los mecanismos moleculares implicados en esta respuesta inflamatoria, destacan mecanismos redox-sensibles, la activación de proteínas quinasas y la activación de factores de transcripción como AP-1 o NF- κ B (Barchowsky y cols., 1995; Bowie y O'Neill, 2000; Beswick y cols., 2001b). Así, la actividad de NF- κ B está aumentada en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y tejidos de animales hipertensos y su inhibición mejora el daño a órganos como el corazón o el riñón y disminuye la presión arterial (Muller y cols., 2000).

3.2. CAMBIOS ESTRUCTURALES, MECÁNICOS Y FUNCIONALES VASCULARES ASOCIADOS CON LA HIPERTENSIÓN

La hipertensión produce cambios estructurales y mecánicos en las distintas capas de la pared vascular. Una alteración clave vinculada a esta patología es el remodelado vascular, definido como las modificaciones estructurales que conducen a la alteración del espesor de la pared y del diámetro de la luz y van a ser consecuencia o causa del incremento de la resistencia periférica (Mulvany, 1999; Intengan y Schiffrin, 2000). Este remodelado puede ser inducido a través de la adaptación pasiva a cambios crónicos en factores hemodinámicos y/o a través de factores neurohumorales como Ang II o ROS. Se pueden encontrar tres tipos de remodelado vascular: 1) el remodelado hipertrófico, que conlleva un incremento en la cantidad de material del vaso, generalmente de proteínas de matriz como colágeno y fibronectina; 2) el remodelado hipotrófico, que conlleva una disminución de la misma y, 3) el remodelado eutrófico, que implica una reordenación de los distintos componentes de la pared vascular sin cambio en la cantidad de los mismos (Mulvany, 1999). Además, el remodelado puede ser hacia el interior del vaso, cuando hay una reducción del diámetro interno del vaso, hacia el

exterior, cuando se produce un incremento en el diámetro, o compensado, cuando el diámetro interno no se modifica (Fig. 17).

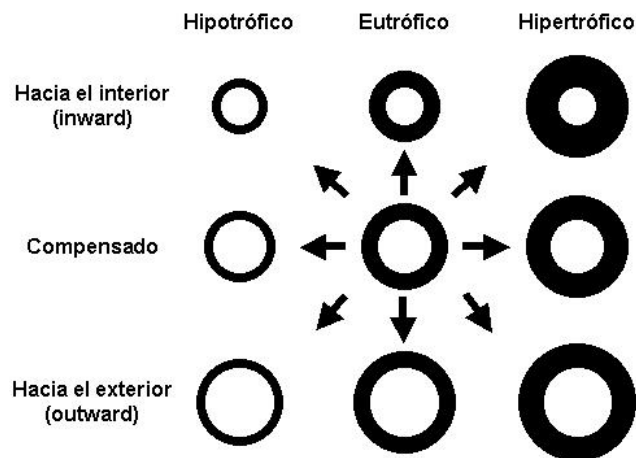


Fig. 17: Tipos de remodelado vascular. Adaptado de Mulvany, 1999.

En los vasos de resistencia, tanto en hipertensión esencial humana como en ratas SHR, coexisten un remodelado eutrófico (diámetro de la luz vascular disminuido con volumen de pared por unidad de longitud conservada) e hipertófico (diámetro de la luz vascular disminuido con volumen de pared por unidad de longitud aumentada) hacia el interior. Este remodelado vascular se debe a un incremento del volumen de la capa media y del número de capas de células musculares lisas, así como a un aumento en la deposición de proteínas de matriz extracelular (Intengan y Schiffrin, 2000; Mulvany, 2008).

El remodelado vascular se ha asociado también a cambios en las propiedades mecánicas de la pared vascular. Así, un aumento de la rigidez del vaso favorece una reducción del diámetro interno afectando a la resistencia periférica. Parece ser que los cambios en la rigidez son fundamentalmente debidos a alteraciones en las fibras de elastina, en el contenido de colágeno, en las proteínas de la matriz extracelular y en las moléculas de adhesión (Intengan y Schiffrin, 2000; Briones y cols., 2003). Además, la actividad de las enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, MMPs, también puede estar disminuida con la hipertensión, lo que conduciría a un aumento de la cantidad de proteínas de matriz (Touyz, 2005).

Hay estudios que muestran que la reducción en la presión sanguínea *per se* no protege del remodelado vascular asociado a la hipertensión y, por tanto, de los riesgos que dicho remodelado tiene sobre órganos diana. De ahí que en la búsqueda de tratamientos antihipertensivos efectivos se hayan propuesto fármacos capaces tanto de bajar la presión arterial como de mejorar el remodelado vascular asociado a esta patología (Mulvany, 2008).

Además de los cambios estructurales y mecánicos, en la hipertensión se producen cambios funcionales. La disfunción endotelial es considerada uno de los factores principales responsables del incremento y mantenimiento de la hipertensión. Así, en determinados modelos de hipertensión se ha observado una disminución de las relajaciones dependientes de endotelio (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Schulz y cols., 2011). Sin embargo, se han descrito también respuestas aumentadas (Dowell y cols., 1999; Hernanz y cols., 2008) y no alteradas (Hutri-Kähönen y cols., 1999; Briones y cols., 2002a), dependiendo del lecho vascular y el modelo de hipertensión estudiado. Además, en la hipertensión se ha observado un incremento en las respuestas contráctiles a diferentes agonistas como serotonina (Russell y cols., 2002), fenilefrina (Alvarez y cols., 2005) y H₂O₂ (Rodríguez-Martínez, 1998), aunque también se han descrito respuestas vasoconstrictoras disminuidas (Arribas y cols., 1996; Briones y cols., 1999; Rossoni y cols., 2002a; 2002b) o similares a agentes como acetilcolina (Le Marquer-Domagala y Finet, 1997) o noradrenalina (Briones y cols., 2000). Asimismo, se han descrito también alteraciones en la sensibilización de la maquinaria contráctil al Ca²⁺ (Lee y cols., 2004) e incremento del tono simpático (Marín, 1993), entre otras modificaciones, que podrían contribuir al incremento de la resistencia vascular en la hipertensión.

A continuación se describen las alteraciones asociadas con la hipertensión arterial en algunos de los principales mediadores que controlan el tono vascular: NO, prostaglandinas y ROS.

3.3. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA VÍA DE LA NOS

Algunos autores han descrito que la disfunción endotelial observada con la hipertensión puede ser debida a la disminución en la producción de NO (Chou y cols., 1998; Dowell y cols., 1999), o a la disminución de la actividad de los canales K_{Ca} implicados en la relajación mediada por EDHF (Kusama y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios muestran un incremento en la síntesis de NO, probablemente como mecanismo compensatorio frente al incremento de la presión arterial (Briones y cols., 2000; Rossoni y cols., 2002b). A pesar de lo anteriormente mencionado, uno de los mecanismos más aceptados para explicar la disfunción endotelial asociada a la hipertensión es la disminución de la biodisponibilidad del NO, debida probablemente a un aumento de la generación de O_2^- que, como se ha comentado, puede combinarse con el NO para formar $ONOO^-$ (Lyle y Griendling, 2006; Paravicini y Touyz, 2008).

También se han descrito cambios en la expresión de las distintas isoformas de la NOS con la hipertensión. Así, la expresión de eNOS está disminuida en aorta de ratas SHR (Chou y cols., 1998) y de ratas Dahl sal-sensibles (Zhou y cols., 2004). Sin embargo, otros autores han demostrado en aorta y arterias mesentéricas de resistencia que la expresión de eNOS está aumentada (Vaziri y cols., 2000a; Ulker y cols., 2003) o no modificada (Briones y cols., 2000; Cediél y cols., 2003) en hipertensión. Por otro lado, se han observado aumentos en la expresión de nNOS (Boulanger y cols., 1998; Briones y cols., 2000) y de iNOS (Briones y cols., 2000; Alvarez y cols., 2008) en diferentes modelos de hipertensión.

3.4. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA VÍA DE LA COX

En la hipertensión parece existir un desequilibrio entre factores vasoconstrictores y vasodilatadores derivados de COX, donde los vasoconstrictores serían predominantes (Davidge, 2001). Así, se ha descrito que la disminución de la relajación dependiente de endotelio puede deberse al aumento en la producción de prostanoides vasoconstrictores, como TXA_2 o isoprostanos, los cuales actúan sobre receptores TP y enmascaran los efectos vasodilatadores del NO (Félétou y cols., 2006), así como al incremento en la vasoconstricción inducida por estos derivados de COX (Taddei y

Vanhoutte, 1993; Zerrouk y cols., 1998). En este sentido, se ha descrito que en aorta de SHR, inhibidores de COX-1 y en menor medida de COX-2, previenen respuestas contráctiles inducidas por acetilcolina (Ge y cols., 1995; Yang y cols., 2002). Además, algunos autores han demostrado que la expresión y actividad de COX-1 es significativamente mayor en células endoteliales de aorta de SHR que de WKY (Ge y cols., 1995; Tang y Vanhoutte, 2008), habiéndose sugerido que las ROS podrían estar implicadas en la activación de COX-1 en aorta de ratas SHR (Yang y cols., 2002).

Por otra parte, en pacientes con hipertensión esencial (Taddei y cols., 1997) y en distintos modelos animales como ratas SHR (Briones y cols., 2002b; Alvarez y cols., 2005; Blanco-Rivero y cols., 2005;), DOCA-*salt* (Adeagbo y cols., 2005) o Dahl sal-sensibles (Jaimes y cols., 2008), se ha descrito un incremento en la expresión de COX-2 y en la producción de prostanoïdes contráctiles, los cuales pueden jugar un papel clave en el desarrollo y/o mantenimiento de la hipertensión (Alvarez y cols., 2005; Jaimes y cols., 2008). Así, prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 están implicados en la disfunción endotelial y en el aumento de las respuestas vasoconstrictoras descritas en animales hipertensos (Blanco-Rivero y cols., 2005). Sin embargo, a pesar de la participación de prostanoïdes contráctiles en las alteraciones vasculares de la hipertensión, también se han descrito acciones beneficiosas de derivados de la COX, que pueden contrarrestar los efectos nocivos de la enfermedad. De hecho, resultados de ensayos clínicos y meta-análisis indican que los antiinflamatorios de tipo no esteroideo (AINES) y, especialmente los inhibidores selectivos de COX-2, tienen importantes efectos cardiovasculares adversos que incluyen infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, fallo coronario, fallo renal e hipertensión arterial (Batlouni, 2010). Hay estudios que muestran que los inhibidores selectivos de COX-2 empeoran la hipertensión en humanos y el riesgo cardiovascular, posiblemente como consecuencia de la inhibición de la producción de prostaciclina (Antman y cols., 2005).

El aumento en los niveles de citoquinas circulantes (Sanz-Rosa y cols., 2005; Vila y Salices, 2005; Savoia y Schiffrin, 2006), el aumento del RAS (Ruiz-Ortega y cols., 2006; Kobori y cols., 2007), la mayor activación tanto de factores de transcripción proinflamatorios (Bowie y O'Neill, 2000; Beswick y cols., 2001b) como de las MAPKs

(Izumi y cols., 2000; Beltrán y cols., 2009) que ocurren en la hipertensión, podrían contribuir al incremento de la expresión de COX-2 observado en esta patología. Además, las ROS, que están incrementadas en hipertensión, pueden aumentar la expresión de COX-2, como se comentará más adelante.

3.5. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ROS

En situaciones fisiológicas existe una ajustada regulación de la producción y eliminación de las ROS; sin embargo, en condiciones patológicas, el desequilibrio entre la actividad de las enzimas generadoras de ROS y su degradación resulta en un incremento de la disponibilidad de ROS, provocando un estado de estrés oxidativo (Taniyama y Griendling, 2003; Harrison y Gongora, 2009). Así, parece que las ROS participan en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión y en las alteraciones estructurales y funcionales descritas en dicha patología (Paravicini y Touyz, 2008). Distintos modelos de hipertensión muestran un aumento del estrés oxidativo asociado tanto a un aumento en la producción vascular de O_2^- (Zalba y cols., 2000; Beswick y cols., 2001a; Wu y cols., 2001; Touyz y Schiffrin, 2004; Lee y Griendling, 2008) o en los niveles plasmáticos de H_2O_2 (Lacy y cols., 1998), como a una reducción de la actividad de las principales defensas antioxidantes vasculares como SOD, GPx, catalasa, tioredoxina, peroxirredoxina y barredores de ROS como vitamina A, C y E (Redón y cols., 2003; Polizio y Peña, 2005; Chaves y cols., 2007) (Fig. 18). Sin embargo, también existen resultados contrarios, donde un incremento en la expresión de las SODs y GPx en aorta de ratas hipertensas se interpreta como un mecanismo adaptativo para disminuir la elevada producción de O_2^- , favoreciendo la conversión de O_2^- a H_2O_2 en dicha enfermedad cardiovascular (Fukai y cols., 1999; Meng y cols., 2002).

De acuerdo con el incremento en la producción de ROS, se ha descrito una incrementada expresión y actividad de enzimas como la XO, NOS o NAD(P)H oxidasa, (Hamilton y cols., 2001; Zalba y cols., 2001). Así, la NAD(P)H oxidasa se activa en distintos modelos animales, incluyendo hipertensión inducida por Ang II (Fukui y cols., 1997), SHR (Zalba y cols., 2000) o DOCA-salt (Beswick y cols., 2001a), entre otros. Por su parte, en SHR, se han demostrado niveles elevados de XO a nivel endotelial e incremento en la producción de ROS, las cuales se han asociado con un incremento del

tono vascular (Suzuki y cols., 1998). Marcadores de estrés oxidativo como malondialdehído (MDA) e isoprostanos también están aumentados en hipertensión (Donmez y cols., 2002; Alvarez y cols., 2007).

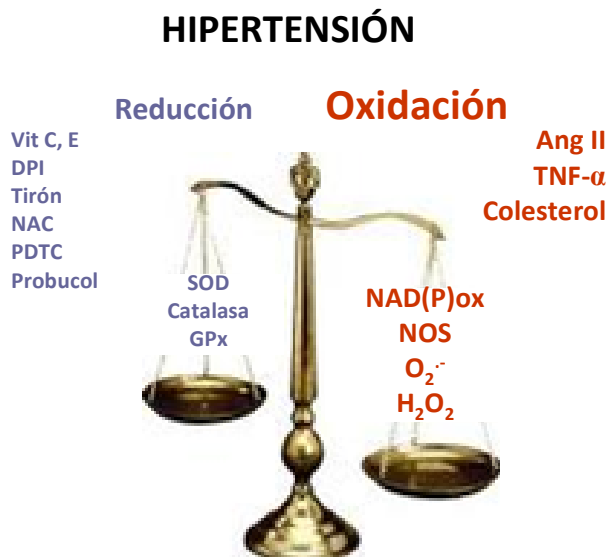


Fig. 18: Balance redox en hipertensión. Estímulos extracelulares como angiotensina II (Ang II), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o hipercolesterolemia modifican el balance hacia un estado proinflamatorio. *DPI*: yoduro de difenileno; *GPx*: glutatión peroxidasa; *NAC*: N-acetil cisteína; *NAD(P)H ox*: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; *NOS*: óxido nítrico sintasa; *PDTC*: pirrolidinditiocarbamato; *SOD*: superóxido dismutasa; *Vit C,E*: vitamina C,E.

La disfunción endotelial y el aumento en la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores descritos en la hipertensión también se relacionan con el aumento en el estrés oxidativo (Beswick y cols., 2001b; Alvarez y cols., 2007; 2008) debido a la capacidad del O₂⁻ de reducir la biodisponibilidad de NO y a la generación de ONOO⁻ (Bachschnid y cols., 2003; Schildknecht y Ullrich, 2009). Además, algunos trabajos muestran un incremento en las contracciones producidas por ROS en aorta (Rodríguez-Martínez y cols., 1998; García-Cohen y cols., 2000) y en arteria mesentérica de animales hipertensos (Gao y Lee, 2001; García-Redondo y cols., 2009b) y que el O₂⁻ generado por XO aumenta las respuestas vasoconstrictoras en aorta de ratas SHR (Auch-Schwelk y cols., 1989). Por otra parte, la función de la mayoría de los sistemas transportadores de Ca²⁺ también puede verse afectada por ROS (Kourie, 1998), lo que permite a las ROS modular la [Ca²⁺]_i que, como vimos, es el principal determinante de la contracción del músculo liso. Así, Tabet y cols. (2004) han demostrado en CMLV que H₂O₂ y O₂⁻ inducen aumentos de las [Ca²⁺]_i, que son mayores en células de ratas SHR (Fig. 19).

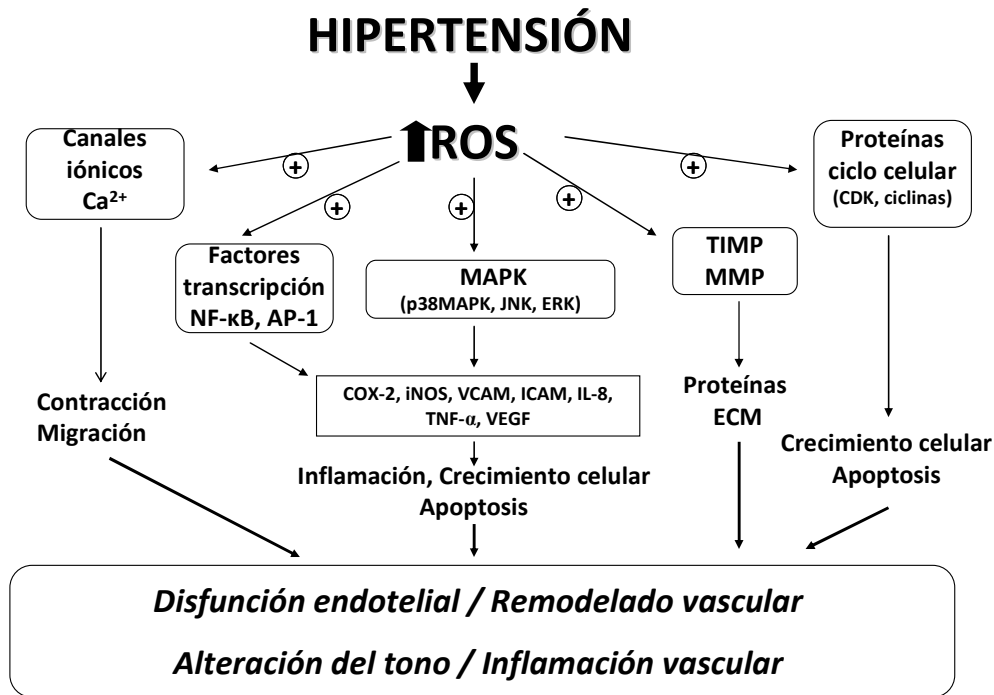


Fig. 19: ROS e inflamación vascular. El aumento de ROS observado en hipertensión modifica la actividad de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y proteínas del ciclo celular. ROS también influye en la expresión de proteínas y genes por activar factores de transcripción como NF-κB o AP-1. ROS además estimula canales iónicos, como los canales de K⁺ y Ca²⁺ de la membrana, conduciendo a cambios en la concentración de cationes. La activación descontrolada de estas vías redox-sensibles puede contribuir al daño vascular por incrementar la expresión de moléculas de adhesión (ICAM, VCAM), factores de crecimiento como VEGF, citoquinas (IL-8, TNF-α) o enzimas proinflamatorias (COX-2, iNOS), lo que conduce a las alteraciones estructurales, mecánicas y funcionales observadas en hipertensión. *AP-1*: proteína activadora-1; *CDK*: quinasas dependientes de ciclina; *COX-2*: ciclooxigenasa-2; *ECM*: matriz extracelular; *ERK*: proteínas quinasas activadas por señales extracelulares; *ICAM*: molécula de adhesión celular inducible; *IL-8*: interleuquina-8; *iNOS*: óxido nítrico sintasa inducible; *JNK*: proteína quinasa del extremo N terminal de c-jun; *NF-κB*: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; *MMP*: metaloproteasa de matriz; *TIMP*: inhibidor de tejido de metaloproteasas; *TNF-α*: factor de necrosis tumoral-α; *VCAM*: molécula de adhesión celular vascular; *VEGF*: factor de crecimiento endotelial vascular. Adaptado de Paravicini y Touyz, 2006.

Por otra parte, se ha descrito que las ROS contribuyen al estado inflamatorio crónico asociado a la patología hipertensiva (Griendling y cols., 2000; Taniyama y Griendling, 2003; Pauletto y Rattazzi, 2006; Marchesi y cols., 2008; Paravicini y Touyz, 2008; Harrison y Gongora, 2009) ya que, como previamente hemos comentado, activan factores de transcripción como NF-κB y AP-1 (Bowie y O'Neill, 2000; Grau y cols., 2004; Paravicini y Touyz, 2006), inducen la expresión de moléculas de adhesión celular como VCAM-1 (Marui y cols., 1993; Costanzo y cols., 2003) e ICAM-1 (Taniyama y Griendling, 2003), participan en la regulación de la expresión y la actividad de la enzima

proinflamatoria COX-2 (Alvarez y cols., 2005; Jaimes y cols., 2005), y median el crecimiento de las CMLV, su migración, la deposición de colágeno y la actividad de MMPs (Touyz y Schiffrin, 2004) (Fig. 19).

Aunque es ampliamente aceptado el incremento en el estrés oxidativo como una consecuencia de la hipertensión, su posible papel causativo en humanos es más controvertido. Hay evidencias que sugieren que el estrés oxidativo es un factor de riesgo para la hipertensión humana, sin embargo esto no explica la etiología de todos los tipos de hipertensión, lo que indica claramente que es una enfermedad poligénica que se desarrolla a través de diversos mecanismos (Lee y Griendling, 2008). En modelos animales si se ha observado una relación causal entre ROS e hipertensión. Así, la inhibición de la generación de $O_2^{\cdot -}$ por la NAD(P)H oxidasa usando estrategias farmacológicas, permite la regresión del remodelado vascular, mejora la disfunción endotelial y disminuye la presión sanguínea en la hipertensión inducida por Ang II (Rey y cols., 2001; Virdis y cols., 2004). Por otro lado, algunos estudios muestran que un tratamiento con vitaminas antioxidantes, miméticos de la SOD, barredores de radicales libres o BH_4 atenúan o previenen el desarrollo de hipertensión (Hong y cols., 2001; Houston, 2005). Además, el tratamiento crónico de SHR jóvenes (5 semanas) con el antioxidante NAC atenúa el desarrollo de hipertensión, aunque no es efectivo en ratas adultas con hipertensión establecida (12 semanas), sugiriendo que las ROS juegan un papel importante en los estadios tempranos de desarrollo de la hipertensión (Pechánová y cols., 2006). El tratamiento crónico con tempol, un barredor de $O_2^{\cdot -}$, reduce el aumento de la presión arterial asociado al envejecimiento en SHR (Nabha y cols., 2005) y normaliza la respuesta incrementada a H_2O_2 en arterias de resistencia de ratas hipertensas (García-Redondo y cols., 2009a). Además, se ha demostrado que en ratas con presión arterial normal la inhibición de la glutatión peroxidasa, enzima que reduce el H_2O_2 a H_2O y los peróxidos lipídicos a alcoholes lipídicos, incrementa las ROS y la presión sanguínea (Vaziri y cols., 2000b). Por otra parte, variaciones genéticas en el promotor del gen de la catalasa de ratas normotensas se ha relacionado con una incrementada susceptibilidad a la hipertensión arterial (Zhou y cols., 2005).

Con los recientes avances en la comprensión de la complejidad del estrés oxidativo y la señalización redox en el sistema vascular, existe un interés creciente respecto de las posibilidades terapéuticas de la interferencia con las ROS como diana del tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares. Esto se basa, por una parte, en las observaciones anteriormente expuestas que demuestran una reducción de la presión arterial con el tratamiento con antioxidantes y con inhibidores de la generación de ROS y, por otro lado, en los efectos beneficiosos asociados, en parte, a la disminución del estrés oxidativo de los agentes β -bloqueantes, inhibidores de la ECA, antagonistas del receptor AT_1 y bloqueantes de canales de Ca^{2+} usados en el tratamiento antihipertensivo (Khan y cols., 2001; Godfraind, 2005). Sin embargo, estas observaciones tampoco responden a la pregunta de si un deterioro del sistema antioxidante contribuye al desarrollo de la hipertensión o si es una consecuencia del exceso de estrés oxidativo relacionado con esta patología.

4. RECEPTORES ACTIVADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS

Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR), clonados por Issemann y Green en 1990, son factores de transcripción activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares (Berger y Moller, 2002). Su nombre deriva de la capacidad de activar la proliferación y el tamaño de los peroxisomas en roedores expuestos a hepatocarcinógenos con actividad hipolipemiente. Los PPAR regulan genes en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado, lo que les confiere un papel clave en el metabolismo lipídico y la homeostasis de glucosa. Además, en CMLV regulan la proliferación, migración, síntesis de ADN, diferenciación y apoptosis celular (Gurnell y cols., 2003; Schiffrin y cols., 2003). Desde el descubrimiento de que los PPAR se expresan en la pared vascular, han sido numerosos los estudios llevados a cabo para conocer los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a las acciones de los PPAR a este nivel (Schiffrin y cols., 2003; Duan y cols., 2009). Hasta la fecha han sido identificadas 3 isoformas codificadas por genes distintos y con distintos patrones de expresión tisular: $PPAR\alpha$, $PPAR\beta/\delta$ y $PPAR\gamma$.

Al igual que otros receptores nucleares, los PPAR poseen una estructura modular compuesta de dominios funcionales y comparten entre un 70 y un 80% de homología

en sus dominios de unión a ligando y dominios de unión a ADN (Neve y cols., 2000; Berger y Moller, 2002). Desde el extremo amino al carboxilo terminal se encuentran: un dominio regulador de la actividad del receptor (dominio A/B), que contiene una función de transactivación independiente de ligando (AF-1), y que es responsable de la fosforilación de los PPAR; un dominio de unión a ADN (DBD), que reconoce secuencias específicas para PPAR en los genes diana, llamadas elemento de respuesta a PPAR (PPRE); una región bisagra (D) y un dominio de unión a ligando (LBD), responsable de la activación de PPAR, y por tanto, de la activación transcripcional. Este dominio LBD contiene una función de transactivación que depende de ligando (AF-2) y es el que permite el reclutamiento de cofactores (Neve y cols., 2000; Blanquart y cols., 2003) (Fig. 20).

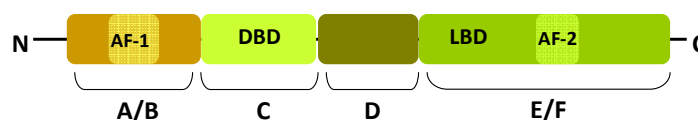


Fig. 20: Estructura general de los PPAR. *AF-1*: función de transactivación-1; *AF-2*: función de transactivación-2; *DBD*: dominio de unión a DNA; *LBD*: dominio de unión a ligando.

4.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RECEPTORES PPAR

Se han identificado un gran número de cofactores, tanto coactivadores como correpresores, que median la capacidad de los receptores nucleares de iniciar o suprimir la transcripción de genes.

4.1.1. Activación génica dependiente de ligando

En un estado inactivo, es decir, cuando PPAR no está unido a ligando, el receptor nuclear heterodimeriza con un complejo correpresor, como el correpresor nuclear (NCoR), cuya actividad histona deacetilasa inhibe la transcripción. Cuando un ligando específico se une a los receptores nucleares PPAR, se promueve una modificación alostérica en el extremo carboxilo terminal de éstos que induce la liberación de los correpresores y el reclutamiento de coactivadores transcripcionales, como la proteína de unión a CREB (CBP), la proteína p300, el receptor coactivador esteroideo-1 (SRC-1), la proteína de unión a PPAR (PBP) o el coactivador del receptor activador de la

proliferación de peroxisomas gamma-1 (PGC-1), permitiendo así su unión al receptor X del ácido cis-retinoico (RXR). El heterodímero PPAR-RXR más los coactivadores se unen a PPRE en la región promotora de genes diana para iniciar así una secuencia de eventos que inducen un proceso de transcripción génica (Kota y cols., 2005; Ricote y Glass, 2007) (Fig. 21). Ligandos diferentes inducen cambios conformacionales distintos y reclutamiento de diferentes coactivadores, resultando en acciones diferentes del receptor.

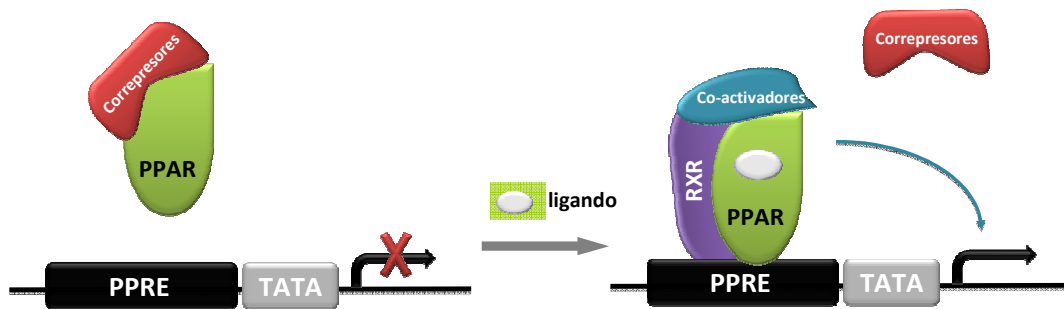


Fig. 21: Transactivación génica dependiente de ligando. La activación de PPAR por ligando permite el reclutamiento de coactivadores y heterodimerización con el receptor X del ácido cis-retinoico (RXR), activando la transcripción mediante la unión directa a elementos de respuesta a PPAR (PPRE) en los genes diana. Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

4.1.2. Represión génica dependiente de ligando

Los PPAR, además de activar la transcripción de genes implicados en el metabolismo lipídico y glucídico, también son capaces de regular negativamente la expresión de otros genes de manera independiente a su unión a ADN. Este mecanismo, denominado de transrepresión, es el que explica la mayoría de los efectos que los PPAR tienen sobre la respuesta inflamatoria asociada a patologías cardiovasculares y desórdenes metabólicos como la hipertensión o la diabetes.

La represión génica puede ser llevada a cabo por varios mecanismos. Un primer mecanismo implica la inhibición de otras vías de señalización por unión del heterodímero PPAR-RXR a coactivadores, cuyos niveles intracelulares suelen ser limitantes, y que son esenciales para todos los factores de transcripción que inducen la expresión de genes proinflamatorios como NF- κ B, AP-1, STAT-1 o NFAT. Los PPAR pueden competir por el reclutamiento de estos coactivadores o reducir la activación de

los mismos, inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios y, por lo tanto, reduciendo la respuesta inflamatoria (Fig. 22) (Li y cols., 2000; Ricote y Glass, 2007).

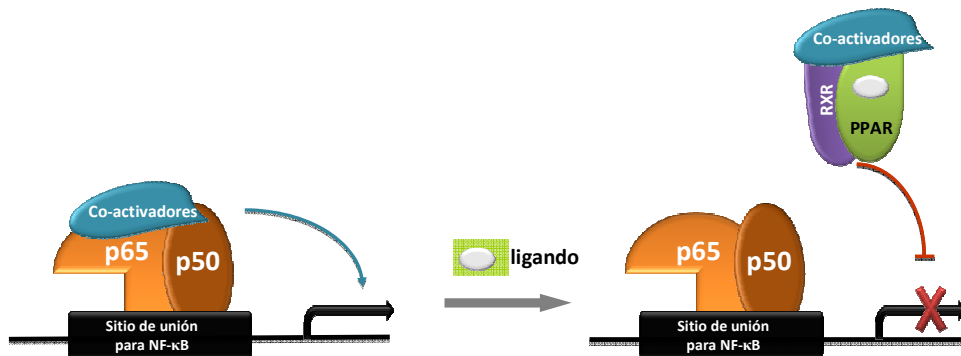


Fig. 22: Competición de los PPAR por un *pool* limitado de coactivadores necesarios para la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria. *NF-κB*: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; *RXR*: receptor X del ácido cis-retinoico. Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

El segundo mecanismo de transrepresión implica la estabilización de complejos correpresores como NCoR o SMRT (mediador-silenciador de los receptores de retinoide y hormona tiroidea), los cuales inhiben la activación de factores de transcripción proinflamatorios y funcionan como freno para la expresión activa de los genes bajo su control. La adición covalente de grupos SUMO (modificadores tipo ubiquitina de pequeño tamaño), facilitada por la proteína inhibidora de STAT1 activada (PIAS1), a las histidinas de los PPAR les permite interactuar y estabilizar a estos complejos correpresores y evitar, por lo tanto, la activación transcripcional de genes implicados en la respuesta inflamatoria (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 23).

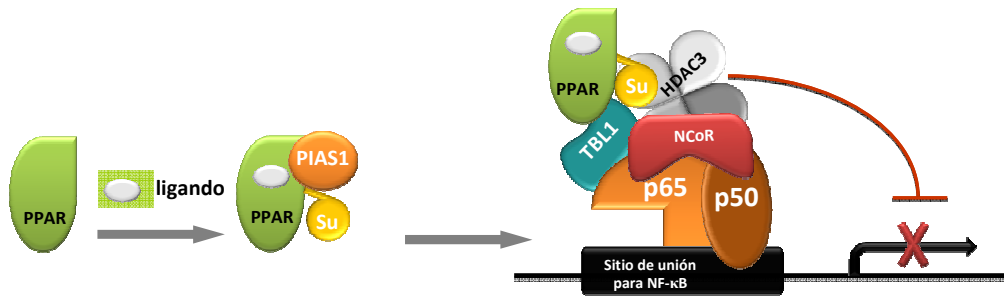


Fig. 23: La estabilización de los complejos correpresores. PPAR, por *sumoilación* de histidinas, puede inhibir la respuesta inflamatoria por bloquear la señal dependiente de la liberación de complejos correpresores como NCoR (correpressor nuclear). *HDAC3*: histona deacetilasa 3; *NF-κB*: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; *PIAS1*: proteína inhibidora de STAT1 activado; *Su*: grupo sumo; *TBL1*: proteína similar a transducina β1. Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

El tercer mecanismo ocurre a través de la unión directa del complejo PPAR-RXR a distintos factores de transcripción, inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios dependientes de la activación de estos factores (Ricote y Glass, 2007). Esto se ha demostrado con NFAT en células T (Yang y cols., 2000), con la subunidades p65 y/o p50 de NF-κB en células musculares lisas de aorta humanas (Delerive y cols., 1999a) o en macrófagos (Chung y cols., 2000) y con c-Jun de AP-1 en células endoteliales de aorta humanas (Delerive y cols., 1999b) (Fig. 24).

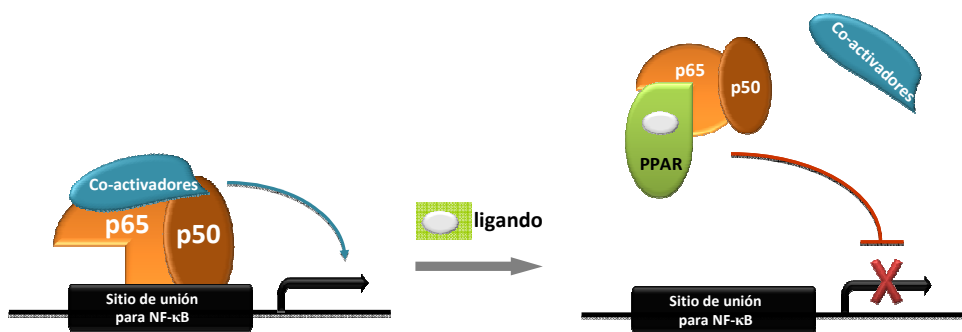


Fig. 24: Interacción directa entre PPAR y la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB (factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B), impidiendo la unión de este factor al promotor de sus genes diana. Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

Por otra parte, el aumento de la expresión del inhibidor α de NF-κB (IκBα) (Delerive y cols., 2000) o inhibición de su degradación (Chung y cols., 2000; Sung y cols., 2006) y la inhibición de la expresión de la quinasa de dicho inhibidor (IKK) por PPAR (Straus y

cols., 2000; Zingarelli y cols., 2003) contribuyen también a reprimir la expresión génica, pues se inhibe la activación de NF- κ B (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 25).

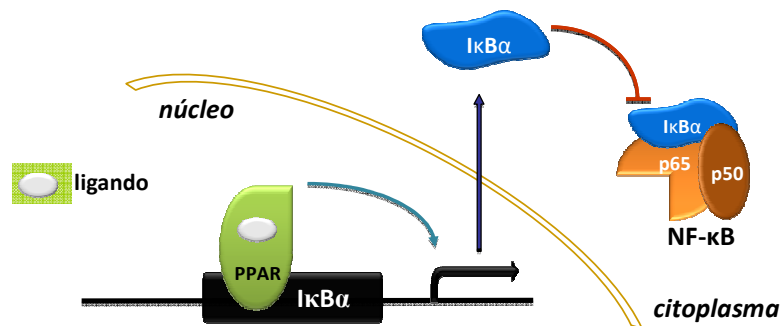


Fig. 25: Inducción de la expresión del inhibidor α de NF- κ B (I κ B α), que reduce la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B (factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B). Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

Un cuarto mecanismo se puede dar por la capacidad de los PPAR de reprimir la expresión de las MAPK como JNK, p38MAPK, ERK 1/2 (Desreumaux y cols., 2001; Rodríguez-Calvo y cols., 2008), de Akt (Goetze y cols., 2002) o PKC (Paumelle y cols., 2006), implicadas en la activación de factores de transcripción proinflamatorios (Fig. 26).

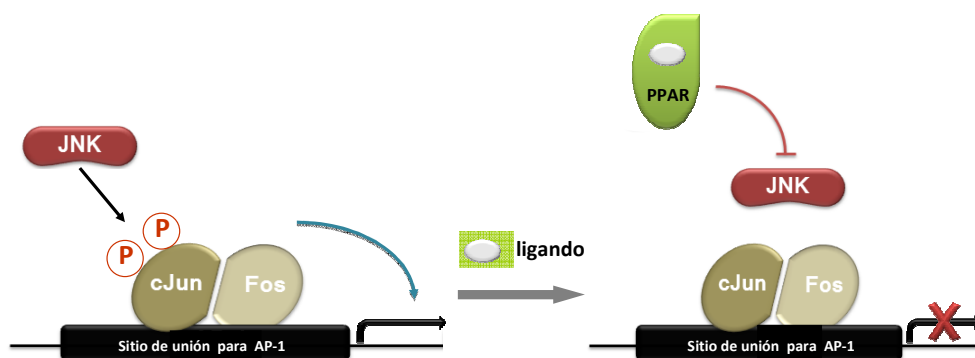


Fig. 26: La activación de PPAR inhibe quinasas JNK (quinasa del extremo N terminal de c-jun), inhibiendo así la fosforilación de c-jun y, por lo tanto, la activación del complejo AP-1 (proteína activadora-1). Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

4.1.3. Represión génica independiente de ligando

Además de los mecanismos anteriormente mencionados, en ausencia de ligando, PPAR pueden heterodimerizar con RXR y bloquear la activación transcripcional uniéndose a los PPRE de los genes diana y reclutando complejos correpresores, antagonizando así la

unión de complejos coactivadores y manteniendo inactiva la expresión génica (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 27).

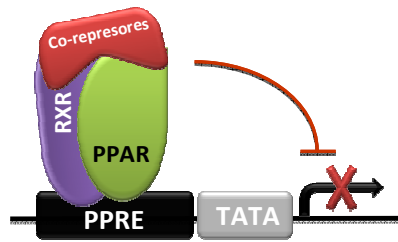


Fig. 27: Represión génica independiente de ligando. En ausencia de ligando los PPAR se unen a los elementos de respuesta a PPAR (PPRE) y reclutan complejos correpresores que median represión activa. Este complejo antagoniza las acciones de los coactivadores y mantiene a los genes en un estado reprimido en ausencia de ligando. *RXR*: receptor X del ácido cis-retinoico. Adaptado de Ricote y Glass, 2007.

4.2. PPAR γ

Los PPAR γ se expresan fundamentalmente en tejido adiposo blanco y son necesarios para la diferenciación de adipocitos, regulando la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo lipídico (Touyz y Schiffrin, 2006). Su expresión también es detectable en una gran cantidad de tejidos como glándulas adrenales, corazón, colon o linfocitos T (Marx y cols., 2004; Touyz y Schiffrin, 2006), así como en todos los tipos celulares de la pared vascular, células endoteliales (Sato y cols., 1999), CMLV (Diep y Schiffrin, 2001), fibroblastos adventiciales (Zhang y cols., 2008) y monocitos/macrófagos (Ricote y cols., 1998), lo que sugiere la posibilidad de efectos directos sobre el tono vascular y la presión sanguínea.

Se han descrito dos isoformas en roedores, PPAR γ_1 y PPAR γ_2 y otras dos isoformas en humanos, PPAR γ_3 y PPAR γ_4 , cuyo producto génico es idéntico al de PPAR γ_1 . Las diferentes isoformas son codificadas por el mismo gen pero expresadas a partir de promotores distintos y de *splicing* alternativo. La expresión de las distintas isoformas es tejido dependiente. Así, PPAR γ_2 se expresa principalmente en tejido adiposo, mientras que PPAR γ_1 , además de expresarse en los adipocitos, se expresa en bajos niveles en un amplio rango de tejidos incluyendo corazón, músculo esquelético, colon, intestino, riñón, páncreas, bazo y los componentes de la pared vascular. PPAR γ_3 se encuentra en

tejido adiposo, macrófagos y linfocitos T y la localización de PPAR γ ₄ no está muy clara (Berger y Wagner, 2002).

Dentro del grupo de ligandos naturales capaces de activar PPAR γ encontramos ligandos endógenos como los ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos, los ácidos linoleico, linolénico, araquidónico o eicosapentaenoico (EPA). También actúan como agonistas PPAR γ lípidos oxidados formados por acción de lipoxigenasas, como las formas oxidadas del ácido linoleico, los ácidos 9- y 13-hidroxiocetadecadienoico (9- y 13-HODE). Otros agonistas naturales de PPAR γ son los metabolitos del AA derivados de la vía de la COX-2 como el 15d-PGJ₂ (15-deoxi-delta-12,14-prostaglandina J₂) y derivados de la vía de la lipoxigenasa como 15-HETE (Neve y cols., 2000). Existen, además, ligandos sintéticos como los fármacos pertenecientes a la familia de las tiazolidinedionas (TZDs), troglitazona, ciglitazona, pioglitazona y rosiglitazona, entre otras, que se comportan como agonistas con alta afinidad por los receptores PPAR γ (Schiffrin y cols., 2003; Staels y Fruchart, 2005).

4.2.1. Efectos metabólicos

Entre las múltiples funciones llevadas a cabo por PPAR γ cabe destacar su capacidad para regular varios genes involucrados en el metabolismo glucídico y lipídico y en las acciones llevadas a cabo por la insulina, así como genes que controlan la homeostasis de la energía celular (Staels y Fruchart, 2005). Así, las TZDs, utilizadas como antidiabéticos orales, reducen la hiperglucemia, mejoran el perfil lipídico de los pacientes con diabetes tipo II y la sensibilización a insulina en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (Duran-Sandoval y cols., 2003). Incluso en estados de resistencia a insulina no diabéticos, como pacientes obesos o con tolerancia baja a la glucosa, las TZDs mejoran la sensibilización a la insulina (Martens y cols., 2002). Las más usadas han sido la rosiglitazona y la pioglitazona, las cuales resultan eficaces en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus tipo II, hipercolesterolemia, dislipidemia, aterosclerosis o en pacientes obesos (Tao y cols., 2003; Chiarelli y Di Marzio, 2008). Sin embargo, se han descrito efectos secundarios adversos asociados generalmente al tratamiento crónico con rosiglitazona, como un aumento en el volumen plasmático que provoca una alteración hematológica por disminuir los niveles

de hematocritos y de hemoglobina, lo que hace que el uso de este medicamento no sea recomendable en pacientes con afectación cardíaca (Martens y cols., 2002; Chiarelli y Di Marzio, 2008). Además, el tratamiento crónico con rosiglitazona puede aumentar la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDLs) en plasma, al estimular la hidrólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos, y provocar hipertrofia cardíaca en algunos pacientes, lo que puede derivar en fallo cardíaco. Aunque estos efectos adversos son poco frecuentes, sí son peligrosos, principalmente en individuos diabéticos con enfermedad cardiovascular (Willson y cols., 2001; Chiarelli y Di Marzio, 2008). Así, a finales del 2010 la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha retirado la comercialización de rosiglitazona debido a los potenciales riesgos de tipo cardiovascular observados a partir de ensayos clínicos, estudios observacionales y metanálisis de ensayos clínicos. Por otra parte, en el primer semestre de este año dos artículos publicados por la revista *Diabetes Care* relacionan el tratamiento a largo plazo con pioglitazona con posible riesgo de padecer cáncer de vejiga (Ferrara y cols., 2011; Lewis y cols., 2011). Aunque estas dos evaluaciones no son concluyentes, en Junio de 2011 la agencia francesa de medicamentos ha anunciado la suspensión de la comercialización de este fármaco. Por su parte, el comité de la EMA, tras analizar todos los datos disponibles, concluye que en determinados pacientes diabéticos el balance beneficio-riesgo se mantiene favorable, siempre que se tengan en cuenta una serie de contraindicaciones y advertencias encaminadas a minimizar el modesto incremento de riesgo de cáncer de vejiga observado en algunos estudios.

Entre los efectos metabólicos beneficiosos encontramos que la activación de PPAR γ por TZDs induce la expresión de proteínas como lipoproteína lipasa (LPL) o acil-CoA sintasa que intervienen en la lipólisis de los triglicéridos plasmáticos y su almacenaje en los adipocitos (Staels y Fruchart, 2005). Además, inducen la expresión de la glicerol kinasa adipocitaria, que estimula la incorporación de glicerol en los triglicéridos, reduciendo así la secreción de ácidos grasos libres por los adipocitos (Duran-Sandoval y cols., 2003). Los agonistas PPAR γ también tienen efectos metabólicos beneficiosos sobre tejidos que responden a insulina, como hígado y músculo, algunos de los cuales se deben a señales que provienen de las modificaciones ocurridas en el tejido adiposo; entre estos efectos cabe destacar: 1) el aumento del catabolismo de ácidos grasos; 2) la inducción de la

producción de factores derivados de tejido adiposo con actividad sensibilizadora a la insulina (ej. adiponectina); 3) la supresión de los niveles circulantes y/o efectos de factores derivados de tejido adiposo que causan resistencia a la insulina, como TNF- α o resistina y 4) el aumento en los niveles del transportador de glucosa GLUT-4 (Shimaya y cols., 1997; Berger y Moller, 2002; Martens y cols., 2002). El resultado final de estos mecanismos es contribuir a la reducción de la cantidad de ácidos grasos y triglicéridos circulantes, y mejorar la utilización de la glucosa por los músculos, lo que explica el efecto hipoglucemiante de dichos fármacos (Duran-Sandoval y cols., 2003).

4.2.2. Efectos antiinflamatorios

PPAR γ también tiene un importante papel en la regulación de la respuesta inflamatoria. Así, en células del sistema inmune como células T se ha descrito que la activación de PPAR γ regula, entre otros factores, la producción de IL-2, INF- γ o TNF- α (Clark y cols., 2000; Marx y cols., 2002), mediadores implicados, por ejemplo, en el reclutamiento de linfocitos y monocitos/macrófagos a la pared arterial en aterosclerosis (Tham y cols., 2003). Además, se ha observado que la expresión de PPAR γ se *upregula* en la diferenciación de monocitos a macrófagos (Ricote y cols., 1998) y que PPAR γ , a su vez, regula negativamente la activación de esos monocitos y/o macrófagos al inhibir la expresión de iNOS, MMP-9, IL-12, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α o IL-1 β (Ricote y cols., 1999; Schiffrin y cols., 2003). En células endoteliales vasculares, la activación de PPAR γ reduce la producción de VCAM-1 e ICAM-1 (Tham y cols., 2003; Klotz y cols., 2007), de péptidos vasoactivos como ET-1 (Delerive y cols., 1999b; Satoh y cols., 1999) y mediadores proinflamatorios como MCP-1 (Murao y cols., 1999). En CMLV, a través de la inhibición de la activación de NF- κ B, los agonistas PPAR γ inhiben la expresión de iNOS inducida por IL-1 β (Ikeda y cols., 2000), de MCP-1 y VCAM-1 inducidas por TNF- α (Park y cols., 2006), así como la proliferación y migración de las CMLV (Wakino y cols., 2000; Goetze y cols., 2001).

Uno de los efectos antiinflamatorios más relevantes de PPAR γ a nivel vascular es ejercido sobre el SRA. Tham y cols. (2002) describieron la relación entre la reducción de la expresión de PPAR γ y el incremento en la actividad del SRA como una de las causas responsables de las alteraciones vasculares ejercidas por la Ang II. En este sentido Diep

y cols. (2002b), describieron que el tratamiento tanto con pioglitazona como con rosiglitazona reduce la hiperproliferación celular, la expresión de receptores AT-1, de marcadores de inflamación vascular como VCAM-1 y la actividad de NF- κ B inducida por el tratamiento con Ang II.

La disfunción endotelial, característica de patologías como la hipertensión, la aterosclerosis y la diabetes (Rajagopalan y cols., 1996; Zalba y cols., 2000), se mejora tras el tratamiento con activadores PPAR γ , probablemente debido a sus acciones antioxidantes. Así, la activación de PPAR γ inhibe la producción de ROS de forma paralela a la reducción en la expresión de las distintas subunidades de la NAD(P)H oxidasa, lo que aumenta la biodisponibilidad de NO generado por la eNOS y, por lo tanto, la vasodilatación dependiente de endotelio (Hwang y cols., 2007; Sorrentino y cols., 2007). El efecto antioxidante de PPAR, junto a la observación de que la inducción de COX-2 es mediada por ROS (Peng y cols., 2005) y que, como se comentará más adelante, la activación de PPAR regula negativamente la expresión de esta enzima (Zhao y cols., 2006), sugiere que el efecto beneficioso de estos receptores observado en varias patologías podría llevarse a cabo a través de la reducción del estrés oxidativo.

Aunque el papel de los PPAR γ en el control de la inflamación aún es controvertido, parece que la mayoría de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes se llevan a cabo a nivel transcripcional a través de la activación de un mecanismo de transrepresión sobre vías de señalización como AP-1, C/EBP, STAT-1 o NF- κ B (Ricote y Glass, 2007). Existen numerosos estudios que muestran que la activación de PPAR γ reduce la activación de NF- κ B. Así, la inflamación pulmonar inducida por LPS en ratas debida a la activación de NF- κ B se reduce con el tratamiento con rosiglitazona junto con la reducción en los niveles circulantes de TNF- α , ICAM-1 y mieloperoxidasa, efecto que se acompaña de un incremento en la expresión del propio receptor nuclear (Liu y cols., 2005). La interferencia en la ruta de activación de NF- κ B puede tener lugar a distintos niveles. Así, Chung y cols. (2000) demostraron que PPAR γ podía inhibir la expresión de genes dependientes de NF- κ B interactuando físicamente tanto con la subunidad p65 como con la subunidad p50 y bloqueando así su activación. Por su parte, Zingarelli y Cook (2005) demostraron que la inhibición de la ruta de NF- κ B por los agonistas PPAR γ

ciglitazona y 15d-PGJ₂ también se podía llevar a cabo mediante la inhibición de la actividad de IKK y el aumento consiguiente en los niveles de IκBα. Straus y cols. (2000) demostraron que 15d-PGJ₂ inhibía la degradación de IκBα por modificación covalente de IKK. PPARγ también puede interferir con el factor de transcripción AP-1, bien por interaccionar físicamente con c-Jun (Delerive y cols., 1999b) o bien por inhibir JNK (Khandoudi y cols., 2002), inhibiendo así la activación del complejo AP-1. Además de la interferencia con la activación de estos factores de transcripción llevada a cabo por PPARγ, su capacidad para bloquear la liberación de los complejos correpresores asociados, bloqueando el reclutamiento de coactivadores y, por lo tanto, el inicio de la transcripción, supone otro mecanismo por el cual este receptor nuclear podría regular negativamente la respuesta inflamatoria (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 28).

A pesar de todo lo anteriormente expuesto, el efecto de los agonistas PPARγ sobre la respuesta inflamatoria presenta controversia pues, en la actualidad, cada vez más evidencias confirman que muchos de los efectos ejercidos por sus agonistas podrían ser debidos a mecanismos independientes de PPARγ. El ligando endógeno 15d-PGJ₂ también ejerce efectos antiinflamatorios independientes de PPARγ a través de la modificación directa de residuos de cisteína de IKK y subunidades de NF-κB e inhibición directa de ERK 1/2. Como muestra la figura 28 otro mecanismo protector independiente a PPARγ es por activación de la expresión de proteínas HSP70 (Chawla y cols., 2001; Zingarelli y Cook, 2005).

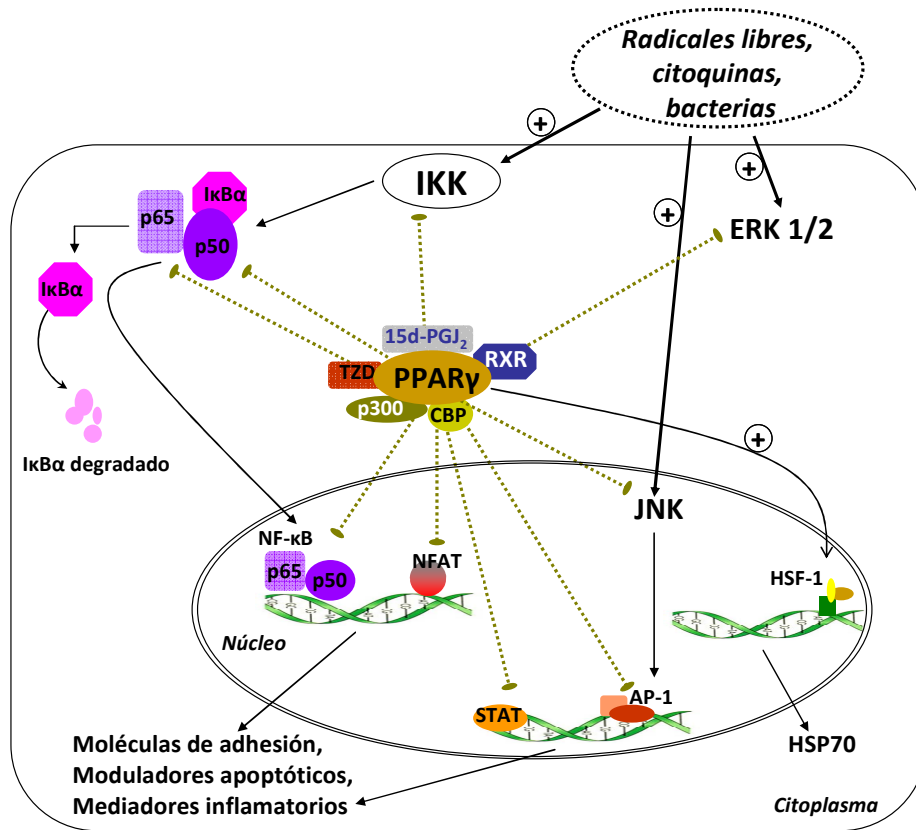


Fig. 28: Mecanismos moleculares antiinflamatorios de PPAR γ . Una vez que PPAR γ es activado por ligandos como 15d-PGJ₂ o tiazolidinedionas (TZD), el heterodímero PPAR γ -RXR compite por el reclutamiento de coactivadores cuya biodisponibilidad es limitada, tales como proteínas de unión a CREB (CBP) o la proteína p300, inhibiendo así la activación de factores de transcripción como AP-1, NF- κ B, STAT o NFAT y, consecuentemente, la expresión de genes proinflamatorios. El heterodímero también transreprime la expresión de genes a través de la unión directa a NFAT y a las subunidades p50 y p65 del NF- κ B o por interacción con JNK. Otro mecanismo protector de 15d-PGJ₂ independiente a PPAR γ es secundario a la activación directa del factor de choque térmico-1 (HSF-1) y expresión de la proteína de choque térmico 70 (HSP70). Las flechas indican efectos positivos y las líneas con acabado romo efectos inhibitorios. Adaptado de Zingarelli y Cook, 2005.

4.2.3. PPAR γ y COX-2

La regulación de la expresión de COX-2 requiere de la activación, entre otros, de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (Tsatsanis y cols., 2006), ambos susceptibles de ser bloqueados por la activación de PPAR γ . En este sentido, Subbaramaiah y cols. (2001) observaron en células epiteliales humanas estimuladas con PMA que la activación de PPAR γ con ciglitazona, troglitazona y 15d-PGJ₂ inhibía la expresión de COX-2 de forma paralela a la reducción en la activación de NF- κ B y AP-1. Confirmando la especificidad de la inhibición de la expresión de COX-2 mediada por PPAR γ , Mendez y LaPointe (2003) comprobaron que el incremento en la expresión de COX-2 en

cardiomiocitos estimulados con IL-1 β se reducía en presencia de 15d-PGJ₂ y troglitazona y que, además, este efecto se revertía tras el tratamiento con el antagonista de PPAR γ GW9662. Por otra parte, Sugawara y cols. (2001) demostraron que la inhibición de la síntesis de prostanoïdes proinflamatorios por PPAR γ en CMLV se lleva a cabo, además de por la inhibición de COX-2, por la reducción en la expresión de otras enzimas, como la TXA₂ sintasa o la de los receptores TP. Sin embargo, otros estudios proponen la participación de PPAR γ en la inducción de COX-2, lo que puede ser explicado por la existencia de un elemento de respuesta a PPAR, PPRE, en el extremo 5' del promotor de COX-2 (Meade y cols., 1999). Bishop-Bailey y Warner (2003) observaron en CMLV tratadas con rosiglitazona inducción de la expresión de COX-2 y PLA₂ y aumento de los niveles de PGD₂ y PGE₂. Además, agonistas PPAR γ incrementaron la expresión de COX-2 en células de carcinoma colorrectal humano (Ikawa y cols., 2001), en células epiteliales mamarias (Meade y cols., 1999), monocitos (Pontsler y cols., 2002), y fibroblastos sinoviales humanos (Kalajdzic y cols., 2002). El efecto que los agonistas PPAR γ tienen sobre la expresión de COX-2 varía dependiendo del tipo celular, el agonista específico utilizado, y la presencia de mediadores inflamatorios adicionales.

4.2.4. PPAR γ e hipertensión

Como ya se ha comentado, en la hipertensión se ha descrito un estado inflamatorio crónico con niveles aumentados de citoquinas proinflamatorias, así como incremento de la expresión de COX-2 y de la producción de ROS. El hecho de que PPAR γ tenga importantes efectos antiinflamatorios sugiere que pueda tener un papel relevante en dicha patología.

El tratamiento con agonistas PPAR γ reduce la presión sanguínea en pacientes o modelos animales con síndrome metabólico y/o diabéticos (Sarafidis y Nilsson, 2006; Chen y cols., 2008). Así, el tratamiento con troglitazona disminuye la presión arterial en pacientes diabéticos (Ogihara y cols., 1995), obesos o en pacientes que presentan resistencia a insulina (Nolan y cols., 1994), relacionando la bajada de la presión, al menos en parte, con una mejora de la sensibilización a insulina. Sin embargo, desde que en el modelo de rata Sprague-Dawley, no hipertensa ni resistente a insulina,

también se observase bajada en la presión arterial al tratar con agonistas PPAR γ , se ha propuesto que la acción hipotensiva de estos compuestos no es solamente ejercida por su capacidad de mejorar la sensibilización a insulina (Buchanan y cols., 1995).

Los resultados en pacientes o modelos animales hipertensos que no presentan síndrome metabólico o diabetes son controvertidos. Así, las glitazonas atenúan el desarrollo de hipertensión tanto en pacientes como en varios modelos animales (Sarafidis y Nilsson, 2006), mientras que en hipertensión establecida, no se observan aparentes efectos antihipertensivos (Llorens y cols., 2007; Nakamura y cols., 2007; Shinzato y cols., 2007; Cipolla y cols., 2010), a menos que se usen tratamientos a largo plazo (Zhang y cols., 2010) o altas dosis de los agonistas PPAR γ (Wu y cols., 2004; Wakino y cols., 2005; Chan y cols., 2010). Sin embargo, a pesar de que el tratamiento con pioglitazona no baja la presión sanguínea en ratas *SHR-stroke prone* (SHR-SP), se observa una protección contra el derrame cerebral (Nakamura y cols., 2007), además de efectos beneficiosos sobre la hipertrofia ventricular izquierda (Shinzato y cols., 2007) y la inflamación y la fibrosis cardiaca (Nakamura y cols., 2008). Además, en el ensayo PROactive (*Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Event*), la bajada de tan solo 3 mmHg observada con el uso de pioglitazona se asocia con una reducción de la mortalidad vascular en pacientes con diabetes tipo II (Dormandy, 2005). Así pues, aunque existe cierta controversia acerca de si los agonistas PPAR γ bajan o no la presión sanguínea, existen evidencias de su capacidad para interferir con la patofisiología de órganos diana en hipertensión.

Entre los mecanismos moleculares que pueden explicar el efecto antihipertensivo de los agonistas PPAR γ se incluyen su capacidad de: 1) reducir la expresión de péptidos que controlan el tono vascular como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) (Kato y cols., 1999), ET-1 (Sato y cols., 1999; Iglarz y cols., 2003) y el péptido natriurético tipo C (Itoh y cols., 1999); 2) disminuir el tono vascular debido a la *downregulación* del receptor AT $_1$ de la Ang II en células musculares lisas (Takeda y cols., 2000); 3) disminuir las concentraciones de calcio por inhibir canales de Ca $^{2+}$ tipo L (Buchanan y cols., 1995) o alterar la sensibilización a calcio (Kawasaki y cols., 1998) en células musculares lisas; 4) estimular la producción de vasodilatadores como NO en

células endoteliales o aumentar su biodisponibilidad por reducir el estrés oxidativo, mejorando así la disfunción endotelial (Calnek y cols., 2003; Nakamura y cols., 2008; Matsumoto y cols., 2008); y 5) mejorar los cambios estructurales en la pared vascular (Ledingham y Laverty, 2005; Zhang y cols., 2010). Así, Diep y cols. (2002b) demostraron que TZDs previenen el desarrollo de hipertensión en ratas infundidas con Ang II y que, en arterias mesentéricas pequeñas estudiadas por miografía de presión, se normaliza la relación media/luz y las relajaciones a acetilcolina. En ratas DOCA-*salt* el tratamiento con rosiglitazona también previene el desarrollo de hipertensión y mejora la disfunción endotelial característica de este modelo de hipertensión (Iglarz y cols., 2003) y, en ratas SHR-SP, Nakamura y cols. (2007) observaron que el tratamiento con pioglitazona, aunque no modifica la presión sanguínea, mejora la disfunción endotelial por reducir ROS.

A pesar de lo anteriormente mencionado, donde se describía que la disminución de ROS podría aumentar la biodisponibilidad de NO, los efectos de las TZDs sobre la generación de NO no están claros. Algunos estudios encuentran incremento en la liberación y/o actividad de NOS, lo que mejoraría la disfunción endotelial como hemos comentado (Calnek y cols., 2003; Dobrian y cols., 2004), mientras que otros estudios no encuentran cambios en la expresión de NOS (Ryan y cols., 2004; Ye y cols., 2006). Cada vez existen más evidencias de que el aumento en la biodisponibilidad del NO por los activadores PPAR γ es debido a la inhibición de la producción de ROS (Matsumoto y cols., 2008), probablemente por inhibición de la expresión de las distintas subunidades de la NAD(P)H oxidasa (Bagi y cols., 2004; Hwang y cols., 2005).

La existencia de alteraciones en los niveles de expresión de PPAR γ en hipertensión es un tema aún bastante controvertido. Tanto en arterias de conductancia como de resistencia procedentes de ratas SHR se ha descrito una menor expresión vascular de PPAR γ , lo que justificaría el incremento en la proliferación, migración, inflamación y fibrosis asociado a este modelo hipertensivo (Wu y cols., 2004). Similares resultados obtuvieron Ameshima y cols. (2003) en un modelo de hipertensión pulmonar. Sin embargo, el análisis de la expresión de PPAR γ llevado a cabo por Diep y Schiffrin (2001) en vasos sanguíneos y en cultivos de CMLV de ratas SHR, las cuales tienen una

mutación en el gen que codifica para la translocasa de ácidos grasos (gen *cd36*), revela que dicha expresión es mayor, lo que interpretan como un posible mecanismo compensatorio en respuesta tanto a la actividad disminuida de *cd36*, como al aumento en la proliferación celular y estado inflamatorio vascular. Por su parte, Xiong y cols. (2005) observaron que, aunque los niveles de ARNm de PPAR γ eran superiores en CMLV de ratas SHR en cultivo, los de proteína eran inferiores, sugiriendo una alteración en los mecanismos de regulación postranscripcional de la expresión de este receptor asociados a la hipertensión.

4.3. PPAR α

PPAR α fue el primer miembro de la familia PPAR clonado y se expresa en numerosos tejidos donde el catabolismo lipídico es importante como en hígado, riñón, intestino, tejido adiposo marrón, músculo o corazón, modulando la expresión de enzimas relacionadas con la ω y β -oxidación y el transporte de ácidos grasos y el metabolismo de lipoproteínas (Staels y Fruchart, 2005). Además, PPAR α se expresa en macrófagos, monocitos, linfocitos T (Neve y cols., 2000; Marx y cols., 2002) y en todos los tipos celulares presentes en la pared vascular, contribuyendo a la regulación de la inflamación en el sistema cardiovascular (Staels y cols., 1998; Berger y Moller, 2002).

PPAR α puede ser activado por una amplia variedad de ligandos endógenos como ácidos grasos y sus derivados, por eicosanoides, ácido docosahexaenoico (DHA), productos de la lipólisis de lipoproteínas o fosfolípidos oxidados, así como por ligandos sintéticos pertenecientes a la familia de los fibratos (Berger y Moller, 2002; Staels y Fruchart, 2005). Los efectos metabólicos beneficiosos ejercidos por los agonistas PPAR α se producen, en parte, por estimular la lipólisis de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) e incrementar la actividad hepática de la LPL, disminuir la expresión en hígado de la apolipoproteína C-III (apo C-III, responsable de la producción de VLDL), aumentar los niveles del gen apo A-I (responsable de sintetizar lipoproteína de alta densidad o colesterol HDL) y reducir los niveles de triglicéridos (Staels y Fruchart, 2005; Leibovitz y Schiffrin, 2007). Además, estimulan la captura de ácidos grasos por la célula y su catabolismo intracelular, aumentando la actividad de la carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I) y de la acil-CoA sintasa (Duran-Sandoval y cols., 2003). De ahí que

estos agonistas sean utilizados en el tratamiento de hipertrigliceridemias, hiperlipidemias, dislipidemias y aterosclerosis (Neve y cols., 2000), donde además se ha demostrado que, al igual que PPAR γ , reducen el riesgo de accidentes cardiovasculares asociados a estos desórdenes metabólicos (Staels y Fruchart, 2005; Staels, 2007).

Además de sus múltiples efectos sobre el metabolismo lipídico, PPAR α presenta propiedades antiinflamatorias a varios niveles. Así, ratones deficientes para PPAR α muestran una exagerada respuesta inflamatoria vascular inducida por LPS o leucotrieno B₄ (LTB₄) (Delerive y cols., 1999a; Berger y Moller, 2002). La activación de PPAR α puede reprimir la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por estímulos inflamatorios extracelulares. Los agonistas PPAR α , entre otros efectos, pueden inhibir la producción de IL-6, prostaglandinas y la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en células del músculo liso aórtico (Staels y cols., 1998), así como reducir la expresión de VCAM-1 inducida por TNF- α (Marx y cols., 1999) o de ET-1 inducida por trombina (Delerive y cols., 1999b) en células endoteliales.

Los efectos antiinflamatorios descritos se deben mayoritariamente a la capacidad de estos receptores de regular por mecanismos de transrepresión, de modo similar a como lo hacía la isoforma γ , la activación de factores de transcripción proinflamatorios entre los cuales se encuentran STAT-1, NF- κ B o AP-1 (Neve y cols., 2000; Delerive y cols., 1999a).

PPAR α puede reducir, además, el estrés oxidativo. En ratas infundidas con Ang II se ha descrito que la activación de PPAR α impide el aumento de presión arterial, disminuye el remodelado vascular de arterias pequeñas de resistencia, y mejora la disfunción endotelial, efectos que se asocian a la reducción de la producción de O₂⁻ por la NAD(P)H oxidasa y de mediadores inflamatorios en la pared vascular (Diep y cols., 2002a). Por otra parte, se ha demostrado que fosfolípidos oxidados pueden activar PPAR α en células endoteliales e inducir la expresión de MCP-1 e IL-8, sugiriendo un efecto potencial proinflamatorio de PPAR α en estas células (Tham y cols., 2003). Estos resultados contradictorios sugieren que son necesarios más estudios para valorar dichos beneficios.

4.4. PPAR β/δ

PPAR β/δ se expresa en niveles bajos pero en una gran variedad de tejidos y tipos celulares, mayoritariamente en cerebro, tejido adiposo y piel, y en menor proporción en tracto digestivo, corazón, riñón, hígado, cardiomiocitos, células del músculo esquelético, macrófagos, monocitos y todos los componentes de la pared vascular (Braissant y cols., 1996; Berger y Wagner, 2002; Wang y cols., 2003). Regulan la mielinogénesis, intervienen en la maduración de las células gliales, en la implantación del embrión y la fertilidad (Kota y cols., 2005) y actúan como un factor de transcripción termogénico por inducir genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y disipación de energía (Wang y cols., 2003).

Estos PPAR pueden ser activados por ligandos endógenos como eicosanoides y ácidos grasos saturados y no saturados (Berger y Moller, 2002). Los beneficios de los agonistas de estos receptores han sido demostrados en hiperlipidemias, aterosclerosis y obesidad (Staels y Fruchart, 2005). Así, se ha demostrado su participación en la disminución de los niveles de triglicéridos y glucosa en modelos de ratones con diabetes tipo II (Berger y cols., 1999), en la disminución del incremento de colesterol HDL en ratones db/db (Leibowitz y cols., 2000) y de los niveles de triglicéridos en monos obesos Rhesus (Oliver y cols., 2001).

OBJETIVOS

La hipertensión arterial se considera una enfermedad de naturaleza inflamatoria que presenta niveles incrementados de citoquinas circulantes como IL-1 β , de moléculas de adhesión celular, de mediadores proinflamatorios como Ang II, así como una elevada expresión y actividad de enzimas proinflamatorias como COX-2. Asociado a este estado proinflamatorio se observa un incremento en el estrés oxidativo plasmático y vascular, debido a la alteración de la activación de proteínas generadoras de O₂⁻ como la NAD(P)H oxidasa y/o de los sistemas antioxidantes, como las SODs, que contribuiría a la disminución de la biodisponibilidad de NO y la disfunción endotelial observada en esta patología. El aumento de ROS también es responsable de la activación de factores de transcripción redox-sensibles como NF- κ B, implicado en la inducción de la expresión de citoquinas como IL-1 β y de enzimas como COX-2. Todo ello podría estar implicado en las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y mecánicas características de la hipertensión contribuyendo así a la génesis y/o mantenimiento de la ésta.

Los PPAR son factores nucleares que se expresan en los distintos tipos celulares de la pared vascular y ejercen sus efectos a través de mecanismos implicados en la reducción del estrés oxidativo y antagonizando las rutas de activación de factores de transcripción proinflamatorios implicados en la liberación de citoquinas o en la expresión de enzimas como COX-2.

El objetivo general de este trabajo ha sido analizar la modulación por PPAR γ de la expresión de COX-2 y del estrés oxidativo así como su papel en las alteraciones vasculares asociadas a la hipertensión. Para ello, se estudiaron los siguientes objetivos concretos:

1. La regulación por PPAR γ de los efectos de la citoquina proinflamatoria IL-1 β sobre la expresión vascular de COX-2.
2. La participación de ROS y NF- κ B en la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β , y la modulación de ambos mecanismos por PPAR γ .

3. El efecto de la activación de PPAR γ sobre el mantenimiento de la hipertensión, así como sobre las alteraciones vasculares funcionales, estructurales y mecánicas asociadas a esta patología.

4. La participación de COX-2, ROS y NO en la función vascular de animales hipertensos y su modulación por agonistas PPAR γ .

Para llevar a cabo estos objetivos hemos utilizado CMLV de aorta de ratas normotensas e hipertensas en las que principalmente se ha analizado:

- La expresión de COX-2 estimulada por IL-1 β en ausencia y en presencia de pioglitazona o en cultivos transfectados con siRNA para PPAR γ .
- Los niveles de ROS y la expresión y actividad de la NAD(P)H oxidasa tras la estimulación con IL-1 β en ausencia y en presencia de pioglitazona.
- El efecto de fármacos antioxidantes en la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β .
- La activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B tras la estimulación con IL-1 β en ausencia y en presencia de pioglitazona.
- El efecto de fármacos inhibidores del proteasoma, que inhiben la activación de NF- κ B, en la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β .

Por otra parte, se han utilizado ratas hipertensas tratadas o no con el agonista PPAR γ pioglitazona y su correspondiente control normotenso donde se ha analizado el efecto del tratamiento sobre:

- La presión arterial.
- Las propiedades estructurales y mecánicas, así como la función vascular (respuestas vasodilatadoras y vasoconstrictoras) de arterias de resistencia.
- La expresión vascular de COX-2, la producción de prostanoïdes y su participación en las respuestas vasoconstrictoras.
- Parámetros de estrés oxidativo a nivel plasmático (MDA) y vascular (niveles de anión superóxido, expresión de NAD(P)H oxidasa y de las enzimas detoxificantes superóxido dismutasa y catalasa), así como la participación de ROS en las respuestas vasoconstrictoras.

- La expresión vascular de eNOS y la participación de NO en las respuestas vasoconstrictoras.
- La expresión vascular de PPAR γ .

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este estudio se han utilizado ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y su control normotenso Wistar Kyoto (WKY) de 5 ó 6 meses de edad, criadas en el animalario de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos (número de registro ES280920000023), donde se mantuvieron bajo las normas institucionales establecidas (temperatura constante; ciclo de luz/oscuridad de 12 h y acceso libre a comida y agua). Para una parte de este trabajo se han utilizado ratas SHR tratadas con pioglitazona (2,5 mg/Kg x día) durante 28 días. El tratamiento se administró por vía oral, para lo cual se disolvió el fármaco en el agua de bebida con 0,5% de carboximetilcelulosa.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y desangrados. Todos los experimentos cumplieron los requisitos de las leyes españolas y europeas (RD 223/88 MAPA y 609/86).

Para la obtención del plasma, se recogieron las muestras de sangre de las ratas mediante punción cardíaca. La sangre fue recogida cuidadosamente en tubos, para evitar la lisis de los hematíes, utilizando 15% K₃EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Plymouth, UK) y conservada en hielo. A continuación, la sangre se centrifugó a 1.500xg durante 10 min a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió el plasma y se mantuvo a -80°C hasta su utilización para determinar la concentración de malondialdehído (MDA).

Se utilizaron **cultivos de CMLV** obtenidos a partir de aorta torácica de ratas WKY y SHR de 5 meses de edad. Estas células se estimularon con la citoquina proinflamatoria IL-1 β y/o con H₂O₂ en ausencia y en presencia del agonista PPAR α fenofibrato y/o de los agonistas PPAR γ pioglitazona, rosiglitazona y 15d-PGJ₂ y se analizó: 1) la expresión proteica en extractos celulares totales de COX-2, NOX-1 y p-IKK y en extractos nucleares de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B, mediante Western Blot, 2) la producción de O₂⁻ y H₂O₂ mediante las técnicas de dihidroetidio (DHE) y diclorofluoresceína (DCF), respectivamente; 3) la actividad de la NAD(P)H oxidasa vascular mediante la quimioluminiscencia emitida por la reacción entre la lucigenina y

O₂⁻; y 4) el efecto de la transfección de los cultivos con un ARN de interferencia específico para PPAR γ sobre los niveles de ARNm de COX-2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Para algunos experimentos se utilizaron **cultivos de fibroblastos** procedentes de aorta de ratas SHR de 5 meses de edad.

Para los **estudios de estructura, mecánica y función vascular** se utilizaron arterias mesentéricas de resistencia (AMR) procedentes de ratas WKY y SHR de 6 meses de edad, así como de SHR tratadas con el activador PPAR γ pioglitazona. El día del experimento los animales fueron sacrificados y una vez extraído el mesentéreo, se introdujo en una solución de Krebs-Henseleit (KHS) burbujeada con una mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ (pH=7,4) y mantenida a 4°C. Las arterias mesentéricas de resistencia fueron cuidadosamente disecadas y limpiadas de grasa adyacente y tejido conectivo e introducidas en la misma solución de KH. La composición de KHS fue la siguiente (en mM): NaCl 115,0; KCl 4,6; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄·7H₂O 1,2; NaHCO₃ 25,0; Glucosa 11,1; Na₂EDTA 0,01 a pH=7,4.

En las terceras ramas de estas arterias se estudió: 1) la estructura y mecánica vascular mediante miografía de perfusión; 2) la respuesta contráctil inducida por fenilefrina y la respuesta vasodilatadora a acetilcolina en experimentos de reactividad vascular mediante miografía de alambres; 3) la localización de la proteína COX-2 por inmunohistoquímica; y 4) la producción de O₂⁻ mediante la determinación de la fluorescencia producida por la oxidación del DHE. Arterias procedentes de todo el lecho mesentérico se utilizaron para determinar: 1) la expresión de las proteínas COX-2, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, EC-SOD y eNOS mediante técnicas de Western Blot; 2) los niveles de ARNm de COX-2, NOX-1, catalasa, PPAR α y PPAR γ mediante RT-PCR; y 3) la producción de PGI₂, 8-isoprostano y PGF_{2 α} en el medio de incubación de las arterias mediante enzimoimmunoensayo con kits comerciales. Las muestras se mantuvieron a -80°C hasta el día de su procesamiento.

2. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial de las ratas se determinó con la técnica de pletismografía en la arteria caudal, originalmente descrita por Buñag (1973). El equipo utilizado para medir la presión es un modelo NIPREM 645 (Cibertec, Madrid, España).

Antes de realizar las medidas, las ratas se mantuvieron en una estufa a 37°C durante 30 min para permitir la dilatación de la arteria caudal. Tras este periodo se colocó un manguito de presión y un sensor de pulso en la cola de la rata. La medida indirecta de la presión arterial con este método es básicamente como la medida que se lleva a cabo con un esfigmomanómetro y el proceso es el mismo que se utiliza en humanos. La presión arterial sistólica se alcanza cuando se detecta nuevamente la onda de pulso tras colapsar la arteria caudal. Para obtener valores de la presión arterial sistólica de cada rata se realizaron un mínimo de cinco medidas y se calculó la media de todas ellas.

Para asegurar la fiabilidad de las medidas, los animales fueron sometidos a un proceso de acostumbamiento una semana antes de comenzar el tratamiento. Las medidas de presión arterial en cada rata se realizaron semanalmente durante el tratamiento con pioglitazona.

3. CULTIVOS DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS

Se trabajó con cultivos primarios de CMLV de aorta procedentes tanto de ratas WKY como SHR obtenidos por explante tisular inmediato al sacrificio del animal, como se indica a continuación. Cada cultivo celular procede de aortas de tres animales, de manera que se minimiza la variabilidad que existe entre animales.

3.1. OBTENCIÓN DE LAS CMLV

De forma inmediata al sacrificio del animal, se aisló la aorta y se colocó en un tubo con medio de cultivo DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conteniendo L-glutamina (1 g/l), piruvato (1 g/l), D-glucosa (1 g/l) y NaHCO₃ (0,08%) para estabilizar el pH del medio y suplementado con seroalbúmina bovina (BSA, 0,1%, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) y antibióticos (200 U/ml de

penicilina y 200 µg/ml de estreptomina, P-S, Invitrogen), con el objeto de reducir posibles contaminaciones durante la manipulación.

A partir de este momento se trabajó dentro de una campana de cultivo de flujo laminar NU-425-300 clase 2 (NuAIRE, Plymouth, MN, USA) con el fin de preservar la máxima esterilidad. Para permitir una mayor manejabilidad de la arteria, ésta se colocó sobre una placa petri cuya superficie se cubrió con silicona (SYLGARD-Silicone elastómero, Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA) y se fijó por los extremos con 2 agujas. Se eliminó la grasa perivascular bajo una lupa Leica S6D (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Una vez limpia de grasa, para facilitar la eliminación mecánica de la capa adventicia vascular, la arteria se incubó con colagenasa tipo II (2 mg/ml) disuelta en DMEM suplementado con BSA (0,1%) y con antibióticos (P-S), durante 30 ó 40 min a 37°C en un incubador NU Autoflow 4750 (NuAIRE) con 95% de aire y 5% de CO₂.

Al final de la incubación y bajo la lupa se eliminó cuidadosamente la capa adventicia, usando pinzas de disección. De esta capa se extrajeron los fibroblastos como se indica posteriormente. A continuación, la arteria sin adventicia se trocó en fragmentos de aproximadamente 2-3 mm que se colocaron en placas de 6 pocillos de 2 cm² de superficie (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) con 2 ml de medio de cultivo DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS, Reactiva S.A., Barcelona, España) descomplementado, y con una mezcla de penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml).

3.2. CRECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLV

Las placas fueron colocadas en el incubador a 37°C con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO₂. Transcurridos unos 7-10 días se comprobó la aparición de CMLV adheridas a la placa procedentes de los explantes tisulares. Durante ese tiempo se fue añadiendo medio de crecimiento cada 48-72 h. Una vez alcanzado en la placa el 50% de confluencia, se retiraron los fragmentos de aorta y se dejó crecer unos 2-3 días más en medio de cultivo DMEM. Cuando se alcanzó una confluencia del 60-70%, aproximadamente a los 15 días de la extracción, las células fueron despegadas. Para ello, en primer lugar las células se lavaron 3 veces con PBS sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺

(Invitrogen), manteniéndose el tercer lavado durante 15 min a 37°C con el fin de favorecer la disgregación celular. A continuación, se retiró el medio de lavado y para despegar las células se incubaron durante 1 min a 37°C con tripsina-EDTA al 0,05% (Invitrogen). Se neutralizó la tripsina añadiendo DMEM con FBS al 10% y las células se sembraron en frascos de 25 cm² (Sarstedt) para aumentar la cantidad de células y el número de pase. Cada tripsinización o pase se llevó a cabo con una frecuencia media de entre 4-7 días. Los experimentos se realizaron en subcultivos de CMLV correspondientes a los pases comprendidos entre el número 3 y el 8.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMLV

Las CMLV en cultivo se estudiaron morfológicamente mediante microscopía óptica de contraste de fase (Microscopio Invertido Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemania). Durante su crecimiento, las células formaron varias monocapas que se solapaban, originando una estructura morfológica típica del músculo liso cultivado, llamada estructura en “colinas y valles” (*hills and valleys*). Las células mantuvieron la morfología de músculo liso a lo largo de su crecimiento en todos los subcultivos utilizados para los distintos experimentos.

El fenotipo de las CMLV en cultivo se determinó mediante técnicas de inmunocitoquímica, determinándose la presencia de α -actina, ya que es la primera proteína que se expresa en las células musculares lisas. Para ello, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti α -actina procedente de ratón (dilución 1:200, Sigma Chemical Co), seguido de incubación con el anticuerpo secundario fluorescente anti-ratón FITC diluido 1:10 (Ex 494 nm; Em 518 nm). La fluorescencia se visualizó mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Wetzlar, Germany), utilizando un objetivo de 63X_{aceite} (zoom 2X) (Fig. 29).

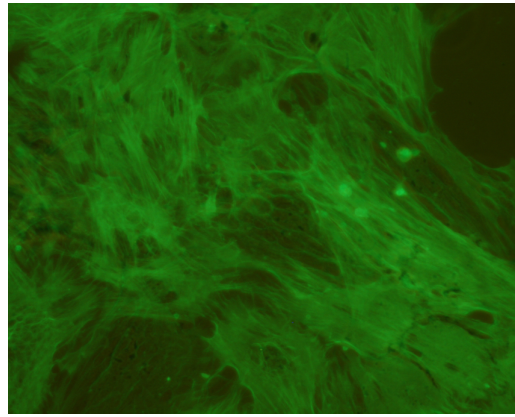


Fig. 29: Fotografía de CMLV en la que se pueden apreciar las fibras de α -actina (verde).

3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN CMLV

Antes del tratamiento con los distintos fármacos, los cultivos de CMLV se ayunaron durante 24 h en un medio libre de suero con el objeto de mantener las células en estado quiescente. Para ello, se retiró el medio DMEM con FBS al 10% y se sustituyó en cada pocillo por 1 ml de DMEM suplementado con BSA al 0,1% y antibióticos P-S.

Para analizar el efecto de la IL-1 β sobre la expresión de COX-2 y otras proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, las CMLV procedentes de ambas cepas se incubaron durante 24 h con la citoquina proinflamatoria. En primer lugar se realizó una curva con diferentes concentraciones de IL-1 β (1-10 ng/ml) para determinar la concentración más adecuada. Una vez seleccionada la concentración de IL-1 β de 10 ng/ml, se realizaron los siguientes abordajes experimentales (Fig. 30).

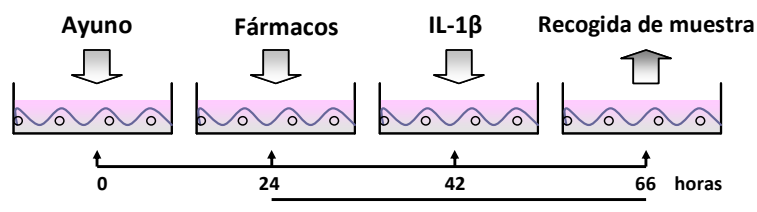


Fig. 30: Esquema representativo del protocolo experimental utilizado en los experimentos de cultivos celulares de ratas WKY y SHR estimulados con IL-1 β .

Para analizar la participación de ROS en el efecto de IL-1 β sobre la expresión de COX-2, los cultivos celulares se incubaron con apocinina (30 μ M) y alopurinol (100 μ M), respectivos inhibidores de NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa, las principales fuentes de ROS en la pared vascular. Además, se utilizó el agente barredor de H₂O₂ catalasa (1.000 U/ml). Estos fármacos se administraron 18 h antes del tratamiento con IL-1 β .

En algunos experimentos se estudió el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la expresión de COX-2, para lo cual los cultivos celulares se expusieron a H₂O₂ (50 μ M) durante 90 min. Previamente se realizó una curva con diferentes concentraciones de H₂O₂ (1-50 μ M) a diferentes tiempos (90 min-4 h).

Para analizar la participación de PPAR α y PPAR γ en la inducción de COX-2 y otras proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria llevada a cabo por IL-1 β y por H₂O₂, los cultivos celulares se trataron con los agonistas PPAR α [fenofibrato (1-50 μ M)] y/o PPAR γ [pioglitazona (1-30 μ M), rosiglitazona (1-30 μ M) y 15d-PGJ₂ (0,1-10 μ M)] durante las 18 h previas al tratamiento con IL-1 β o H₂O₂.

4. CULTIVOS DE FIBROBLASTOS ADVENTICIALES

Los cultivos de fibroblastos se obtuvieron a partir de aorta de SHR de acuerdo con el método descrito previamente por Kim y cols. (1999). Tras la digestión de la aorta con colagenasa, se disecó la capa adventicia y se cortó en pequeños fragmentos que se colocaron en placas de 6 pocillos que contenían 3 ml de DMEM/F-12 (Ham, Invitrogen) suplementado con 10% FBS y una mezcla de penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 μ g/ml). Al cabo de 4-5 días, cuando los cultivos se encontraron aproximadamente a un 30% de confluencia, se tripsinizaron las células y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm². Para evitar la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, a partir del pase 2 las células se suplementaron con 10 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (β -FGF, Invitrogen) y 5 μ g/ml de heparina (Sigma Chemical Co). Los fibroblastos se caracterizaron mediante microscopía óptica por la ausencia de “colinas y valles” y mediante microscopía confocal por la tinción inmunocitoquímica negativa con el anticuerpo anti α -actina y la tinción positiva con el anticuerpo primario anti-vimentina (dilución 1:200, NeoMarkers, Westinghouse, CA, USA) seguido de anticuerpo

secundario fluorescente anti-ratón FITC (Ex 494 nm; Em 518 nm) (Fig. 31). Los cultivos de fibroblastos se emplearon entre los pases 2 y 5.

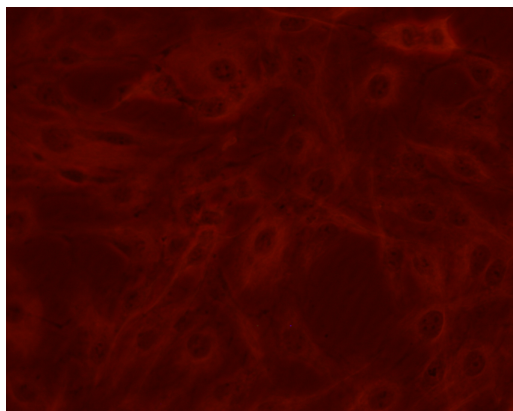


Fig. 31: Fotografía de fibroblastos en la que se pueden apreciar las fibras de vimentina (rojo).

4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN FIBROBLASTOS ADVENTICIALES

Al igual que en los cultivos de CMLV, antes del tratamiento con los distintos fármacos, los cultivos de fibroblastos se ayunaron durante 24 h en un medio libre de suero. Para ello se retiró el medio DMEM/F-12 (Ham) con FBS al 10% y se sustituyó en cada pocillo por 1 ml de DMEM/ F-12 (Ham) suplementado con BSA al 0,1% y antibióticos P-S.

Para analizar el efecto de la IL-1 β sobre la expresión de COX-2, los fibroblastos se incubaron durante 24 h con la citoquina proinflamatoria a una concentración de 10 ng/ml.

Para analizar la participación del agonista PPAR γ en la inducción de COX-2, los cultivos celulares se trataron con el agonista PPAR γ pioglitazona (10 μ M) durante las 18 h previas al tratamiento con IL-1 β .

5. MIOGRAFÍA DE PERFUSIÓN

Para el estudio de las propiedades estructurales y mecánicas de las arterias mesentéricas de resistencia se utilizó el método descrito por Coats y Hillier (1999) que permite medir los cambios en el diámetro externo e interno del vaso en condiciones que se asemejan a las condiciones fisiológicas. Para ello, se utilizó la tercera rama de

dichas arterias sumergidas en una solución de KH-0Ca^{2+} , para evitar la presencia de tono miogénico. Las arterias se montaron entre dos microcánulas de vidrio en un baño de perfusión para vasos pequeños acoplado a un miógrafo de perfusión (Danish Myo Tech, modelo P100; J. P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca; Fig. 32). Después de comprobar que todas las ramas arteriales laterales estuvieran atadas, las paredes del vaso se ajustaron hasta que estuvieron paralelas. Posteriormente, se aumentó la presión intraluminal hasta 140 mmHg y la pared vascular se volvió a ajustar en paralelo. A continuación, se disminuyó la presión intraluminal a 70 mmHg y se estabilizó la preparación durante 30 min a 37°C , antes de realizar los experimentos. Tras el periodo de estabilización, y con la arteria sumergida en KH-0Ca^{2+} , se tomaron medidas del diámetro externo e interno a presiones intraluminales crecientes (3-140 mmHg). Finalmente las arterias se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) durante 1 h a 70 mmHg de presión intraluminal y se almacenaron en PFA a 4°C hasta el día de su utilización.

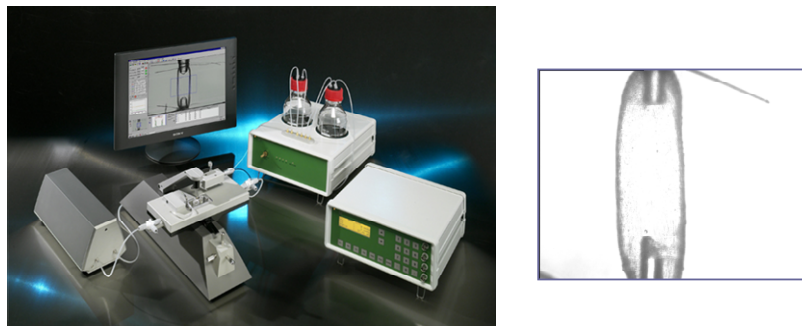


Fig. 32: Componentes del miógrafo de presión y del baño de perfusión y foto de un segmento de AMR montado entre 2 cánulas.

5.1 CÁLCULOS DE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES Y MECÁNICOS

El parámetro estructural relación media/luz se ha calculado mediante la siguiente ecuación:

$$(D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2D_{i0Ca}$$

donde D_{e0Ca} y D_{i0Ca} son, respectivamente, el diámetro externo e interno a cada presión.

Los parámetros mecánicos se han determinado según el método de Baumbach y Heistad (1989):

- Incremento de la distensibilidad: Es el porcentaje de cambios en el diámetro interno en mmHg con respecto al incremento en la presión intraluminal. Se expresa en % y se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Incremento de la distensibilidad} = \Delta D_{i0Ca} / (D_{i0Ca} \times \Delta P) \times 100$$

donde ΔD_{i0Ca} es el incremento del diámetro interno a las distintas presiones, D_{i0Ca} es el diámetro interno a las distintas presiones y ΔP el incremento de presión.

- Estrés circunferencial de la pared (σ): Es la fuerza por unidad de área ejercida por la pared en sentido opuesto a la fuerza ejercida por la presión arterial (Dobrin, 1978). Se expresa en (N/m², dinas/cm²):

$$\sigma = (P \times D_{i0Ca}) / (2 \times \text{Grosor de la pared})$$

donde P es la presión intraluminal (1 mmHg = 1,334 x 10² N/m²) y el grosor de la pared es:

$$(D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2 \text{ a cada presión intraluminal en } 0Ca^{2+}\text{-KHS.}$$

- Tensión (ϵ): Es el incremento fraccional en el diámetro de un vaso cuando se somete a una presión intraluminal:

$$\epsilon = (D_{i0Ca} - D_{00Ca}) / D_{00Ca}$$

donde D_{00Ca} es el diámetro a 3 mmHg y D_{i0Ca} es el diámetro interno a las distintas presiones.

- Relación Estrés-Tensión: La relación estrés-tensión es el módulo elástico de Young (E):

$$E = \sigma / \epsilon$$

Esta relación proporciona una medida de la rigidez intrínseca de un tejido independientemente de la geometría (Dobrin, 1978). La relación estrés-tensión (σ/ϵ) no es lineal por lo que es más apropiado calcular el módulo elástico tangencial o incremental (E_{inc}) a través de la pendiente de la curva estrés-tensión ($E_{inc} = d\sigma/d\epsilon$; Dobrin, 1978). Para determinar la rigidez intrínseca de un tejido, el E_{inc} se calcula aproximando los datos de la relación estrés-tensión de cada animal a una curva exponencial usando la ecuación:

$$\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\epsilon}$$

donde σ_{orig} es el estrés en el diámetro inicial (diámetro a 3 mmHg). Realizando la derivada de dicha ecuación se obtiene $E_{inc} = \beta\sigma$. Para un valor determinado de σ , β es directamente proporcional a E_{inc} . Un incremento en β implica un incremento en E_{inc} , que significa un incremento en la rigidez intrínseca; por lo tanto, la relación estrés-tensión en arterias es una curva exponencial. Esta característica se debe a la distinta participación de la elastina y el colágeno en la mecánica del vaso. La primera parte de la curva representa el comportamiento de la elastina, ya que esta proteína empieza a estirarse a presiones intraluminales bajas; la elevada distensibilidad de la elastina determina que cambios pequeños de presión (estrés) produzcan grandes cambios de diámetro (tensión). La segunda parte de la curva, con mayor pendiente, refleja el comportamiento de la elastina ya estirada y del colágeno, el cual al ser mucho más rígido, no permite grandes cambios en las dimensiones del vaso, aunque el aumento de presión sea grande (Dobrin, 1978).

5.2. ESTUDIO POR MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA DISTRIBUCIÓN NUCLEAR

Las arterias intactas fijadas bajo presión se incubaron con el colorante nuclear Hoechst 33342 (0,01 mg/ml) (Sigma Chemical Co) durante 15 min. Después de realizar 3 lavados de 10 min, las arterias se montaron sobre portaobjetos con unos separadores de silicona para evitar la deformación de la arteria. La fluorescencia fue detectada usando un objetivo de inmersión de 63X_{aceite} en un microscopio confocal invertido Leica TCS SP5, equipado con un láser kriptón/argón (Wetzlar, Alemania) ($\lambda_{ex}=351-364$ nm y $\lambda_{em}=400-500$ nm). Se tomaron imágenes de cortes seriados de 0,5 μ m de grosor desde la

adventicia al lumen, en al menos dos secciones de diferentes regiones a lo largo de la arteria. Después, las proyecciones individuales de los vasos se reconstruyeron con un software de análisis de imagen Metamorph (Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA) y se obtuvo la vista transversal del stack.

6. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Los estudios de reactividad en AMR se realizaron según el método descrito por Mulvany y Halpern (1977). Para ello, segmentos arteriales de aproximadamente 2 mm de longitud se transfirieron a un baño de órganos de un miógrafo dual isométrico (JP-Trading, Dinamarca), en el cual dos alambres de acero de 40 μm de diámetro se introdujeron por la luz de la arteria (Fig. 33).

Después de un periodo de estabilización de 30 min en KHS oxigenada a 37°C y pH de 7,4 las arterias se estiraron gradualmente hasta conseguir la tensión óptima en función de su diámetro. Para ello, en cada segmento arterial se determinó la relación entre la tensión de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso y, a partir de ella, la circunferencia interna correspondiente a una presión transmural de 100 mmHg para un vaso relajado *in situ* (L_{100}). Para la realización de los experimentos, las arterias se situaron con una circunferencia interna L_1 , siendo $L_1 = 0,9 \times L_{100}$, circunferencia a la cual el desarrollo de fuerza es máximo. El diámetro de las arterias se determinó como $l_1 = L_1/\pi$. Una vez finalizado el proceso de normalización, los segmentos arteriales se lavaron y se equilibraron durante 30 min. A continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de los mismos a una solución de alta concentración de potasio (K^+ -KHS, 120 mM) la cual es idéntica a KHS excepto que NaCl fue remplazado por KCl a una concentración equimolar.

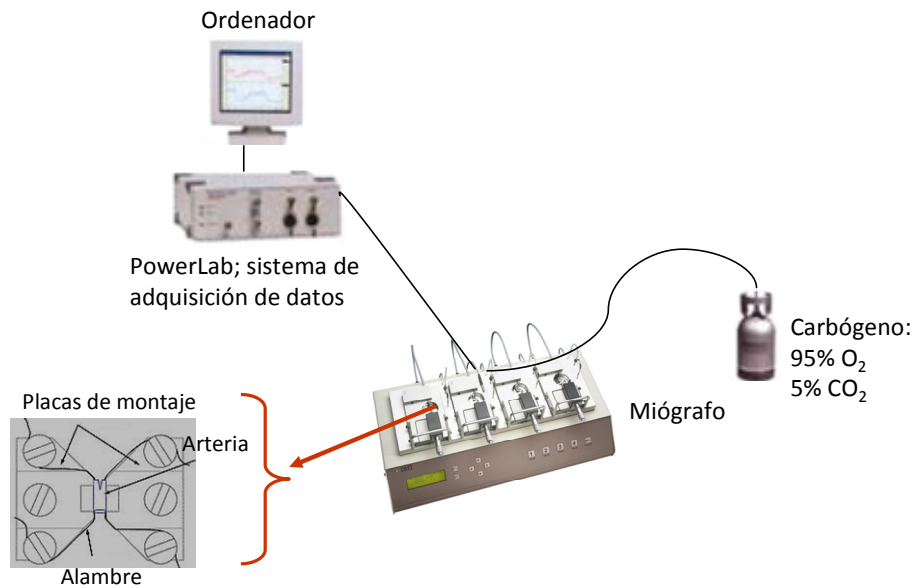


Fig. 33: Esquema representativo del miógrafo de alambres donde se realizaron los experimentos de reactividad vascular.

6.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En primer lugar se determinó la presencia de endotelio funcional por la capacidad de 10 μM de acetilcolina (ACh) de producir relajación en arterias previamente contraídas con el agonista de receptores α_1 -adrenérgicos fenilefrina a una concentración tal que induce aproximadamente el 50% de la contracción producida por K^+ -KHS. Se consideraron segmentos con endotelio funcional aquellos que relajan con ACh más de un 80% del tono previo en ratas WKY y más de un 60% en las ratas SHR. A continuación se procedió al lavado de las preparaciones arteriales y tras 30 min de incubación con distintos fármacos, se realizó una curva concentración-respuesta a fenilefrina (0,1-30 μM) (Fig. 34). En otro grupo de experimentos, se añadió iloprost (1 μM) a las arterias precontraídas con fenilefrina a una concentración que produce aproximadamente un 50% de la contracción inducida por K^+ -KHS en cada caso.

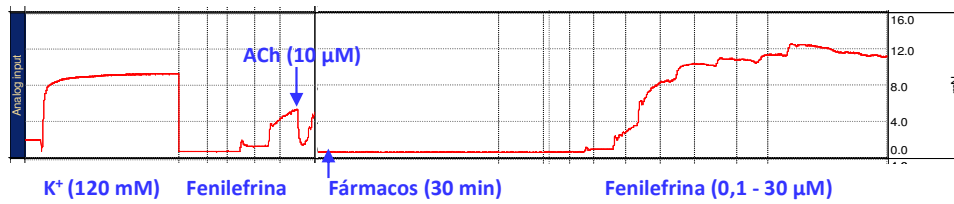


Fig. 34: Esquema general representativo del protocolo experimental realizado en los experimentos de reactividad vascular en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR. ACh= acetilcolina.

La participación de los derivados de la COX-2 en la contracción inducida por fenilefrina se analizó utilizando el inhibidor selectivo de COX-2 NS 398 (1 μM), el antagonista del receptor del $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ SQ 29,548 (1 μM), el inhibidor de la TXA_2 sintasa furegrelato (1 μM), el antagonista del receptor EP_1/EP_3 para la PGE_2 SC 19220 (10 μM), el inhibidor de la PGI_2 sintasa tranilcipromina (10 μM) y el antagonista del receptor IP RO 1138452 (1 μM).

Para determinar el papel del anión superóxido en la contracción inducida por fenilefrina se utilizaron los respectivos inhibidores de las enzimas NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa, apocinina (0,3 mM) y alopurinol (0,3 mM).

Para analizar el papel del NO en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina se estudió el efecto producido por L-N^w-nitroarginina metil éster (L-NAME, 100 μM), inhibidor no selectivo de la NOS, sobre dicha respuesta.

Para determinar el papel del endotelio en la contracción inducida por fenilefrina, se eliminó mecánicamente esta capa vascular. Para ello, una vez montadas las arterias se procedió a introducir un pelo de caballo por la luz del vaso según el método descrito por Osol y cols. (1989). La ausencia de endotelio se determinó por la incapacidad de la acetilcolina de inducir respuestas vasodilatadoras.

7. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOPASMÁTICOS

Las CMLV crecidas en placas p100 (Sarstedt) fueron lavadas con PBS frío 2 veces y homogeneizadas en 100 μl de Buffer A (20 mM HEPES pH=8; 10 mM KCl; 0,15 mM EDTA pH=8; 0,15 mM EGTA pH=8). Tras 5 min en hielo, y para evitar la lisis de los

núcleos, se añadió 1/5 de “*Sucrose Restore Buffer*” (50 mM HEPES pH=7; 25 mM EDTA pH=8; 10 mM KCl; 70% sacarosa). Después de centrifugar 5 min a 4°C y a 5.000 rpm se almacenó el sobrenadante, que contiene los extractos citoplasmáticos, y sobre el precipitado, donde se localizan los núcleos, se añadieron 50 µl de Buffer B (20 mM HEPES; 50 mM NaCl; 25% glicerol; 0,25 mM EDTA pH=8; 0,15 mM EGTA pH=8; 1,5 mM MgCl₂). Sin permitir la disgregación del precipitado y con el fin de eliminar restos citoplasmáticos, se agitó con cuidado para lavar los núcleos y se centrifugó durante 5 min a 4°C y a 5.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y para la extracción de las proteínas del núcleo se resuspendió el precipitado en 30 µl de Buffer C (20 mM HEPES pH=8; 450 mM NaCl; 25% glicerol; 0,25 mM EDTA pH=8; 0,15 mM EGTA pH=8; 1,5 mM MgCl₂) durante 30 min en agitación orbital a 4°C. Tras este periodo se agitó con vortex 10 seg y se centrifugó 5 min a 4°C y a 14.000 rpm y el sobrenadante, donde están los extractos nucleares, se almacenó a -80°C hasta su utilización.

8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

La expresión de las proteínas se determinó mediante técnicas de Western Blot. Los cultivos de CMLV y fibroblastos se lavaron 2 veces con PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺ después del tratamiento y se rascaron en 100-150 µl de buffer de lisis (10 mM Tris, pH=7,4; 1% SDS; 1mM Na₃VO₄) previamente calentado hasta su ebullición. En los experimentos de Western Blot para NOX-1 la solución de homogenización fue la siguiente: 5 mM EDTA; 150 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH=7,4; 0,5% NP-40; 1 mM Na₃VO₄ y 1ml “*Inhibitor Cocktail Complete*” (Roche) 50X/50 ml.

En el caso de las arterias mesentéricas, éstas fueron homogeneizadas con un homogeneizador de vidrio en un buffer Tris-EDTA (50 mM Tris; 1mM EDTA, pH=7,4). A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 4°C y a 10.000 rpm, para separar posibles fragmentos celulares, recogándose el sobrenadante.

La concentración de proteínas en los lisados celulares y en los homogenados arteriales se cuantificó por colorimetría utilizando el método de Micro BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Se calculó el volumen de muestra necesario en función de la cantidad de proteína que se deseaba cargar y se mezcló con un

volumen igual de solución de tampón de carga o tampón Laemmli 5X [300 mM Tris-HCl, pH = 6,8; 10% SDS; 25% β -mercaptoetanol; 0,5% (p/v) azul de bromofenol; 50% glicerol]. La mezcla se incubó a 95°C durante 1 min para desnaturalizar las proteínas.

En un sistema de electroforesis Mini-Protean® 3 Cell (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), se polimerizaron dos geles de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), gel 1 o gel separador (7,5, 10 ó 12% acrilamida, dependiendo de la proteína a estudiar; 4,6% Tris-HCl pH= 8,8; 0,1% SDS; 0,038% persulfato amónico; 0,033% temed; 3,4% glicerol) y gel 2 o gel concentrador (3% acrilamida; 1,49% Tris-HCl pH = 6,8; 0,1% SDS; 0,98% persulfato amónico; 0,053% temed).

Para analizar la expresión de COX-2, 40 μ g de homogenados arteriales y 25 μ g de lisados celulares se separaron electroforéticamente en un SDS-PAGE con 7,5% de acrilamida. En el caso de NOX-1 y p-IKK, 25 μ g de lisados celulares se separaron en un gel al 10% de acrilamida. Para analizar la expresión de p65, 10 μ g de extractos nucleares y citoplasmáticos se separaron en un gel al 10% de acrilamida. Para Cu/Zn-SOD y Mn-SOD, 5 μ g de homogenados arteriales se separaron en un gel al 12% de acrilamida. Para analizar la expresión de EC-SOD, 20 μ g de homogenados arteriales se separaron en un gel al 12% de acrilamida. Para analizar la expresión de eNOS 30 μ g de homogenados arteriales se separaron en un gel al 7,5% de acrilamida. Los geles se introdujeron en una cubeta llena de tampón de electroforesis (25 mM Tris; 200 mM glicina; 1% SDS), que es un electrolito con una alta capacidad de tamponación, y las muestras se cargaron en el gel concentrador junto con el marcador de peso molecular de amplio rango preteñido (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen). A continuación se llevó a cabo la electroforesis aplicando un voltaje constante de 80-100 mV, haciendo que las muestras pasasen por el gel concentrador primero y por el gel separador después.

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (Immun-Blot® PVDF Membrane for Protein Blotting 0,2 μ m, BioRad Laboratories) previamente activadas con metanol. Para ello, el gel, la membrana y varias láminas de papel Whatman se colocaron en un sistema "sandwich" dentro de un sistema de transferencia (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, BioRad),

inmersos en una solución de transferencia (25 mM Tris; 190 mM glicina; 0,05% SDS; 20% metanol) al que se le aplicó una corriente de 230 mA a 4°C durante toda la noche. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se trataron durante 1-2 h a temperatura ambiente en agitación continua con solución de bloqueo (5% leche desnatada; 5% BSA) disuelta en solución de lavado: 10 mM Tris-HCl pH=7,5; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20, para evitar uniones inespecíficas.

Tras el bloqueo, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en agitación continua con los anticuerpos policlonales de conejo anti-COX-2 (1:400, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), anti-Cu/Zn-SOD (0,1 µg/ml, Stressgen Bioreagents Corp., Victoria, Canadá), anti-Mn-SOD (0,05 µg/ml, Stressgen Bioreagents Corp.), anti-EC-SOD (10 µg/ml, Stressgen Bioreagents Corp.), anti-p65 (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) y anti-TBP (1:2.000, Santa Cruz Biotechnology Inc), con los anticuerpos policlonales de cabra anti-NOX-1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc), anti-p-IKK (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc) y anti-IKK (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc), con los anticuerpos monoclonales de ratón anti-eNOS (1:1.000, Transduction Laboratories, Lexington, UK), anti- α -actina (1:1.500.000, Sigma Chemical Co) y anti- β -actina-peroxidasa (1:100.000, Sigma Chemical Co), todos diluidos en solución de lavado con 5% de leche desnatada en polvo. Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados sucesivos de 10 min cada uno con solución de lavado, para eliminar los restos de anticuerpo primario que no se había unido.

Tras los lavados, se incubaron las membranas durante 1 h con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano: anticuerpo IgG anti-ratón (1:5.000, Stressgen Bioreagents Corp.), anticuerpo IgG anti-cabra (1:2.000, BioRad) o anticuerpo IgG anti-conejo (1:2.000, BioRad).

Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos secundarios, se volvieron a realizar tres lavados de las membranas y los inmunocomplejos se detectaron por quimioluminiscencia utilizando el sistema peroxidasa de rábano-luminol (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), técnica basada en la generación enzimática de un éster de

acridino que reacciona con el peróxido, en condiciones ligeramente alcalinas, produciendo una luz de emisión muy intensa y de larga duración. Las membranas se expusieron a autorradiografía (Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, USA) y las señales del inmunoblot se cuantificaron usando el programa informático de cuantificación del Typhoon 9210 (Amersham Biosciences) para PC. Como control de carga para corregir la expresión de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, EC-SOD, eNOS y NOX-1 se utilizó α -actina; para COX-2 se usó la expresión de α -actina en CMLV y β -actina en fibroblastos, p-IKK se corrigió con IKK y para corregir la expresión nuclear de la subunidad del NF- κ B, p65, se usó TBP.

9. TRANSFECCIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA ESPECÍFICO PARA PPAR γ DE CULTIVOS DE CMLV DE SHR

Para comprobar si los niveles de expresión de PPAR γ estaban relacionados con la activación transcripcional de COX-2, se redujo la expresión de este receptor nuclear transfectando cultivos de CMLV de SHR estimulados con IL-1 β con siRNA (*short interfering RNA*) específico para PPAR γ . Con el objetivo de tener en el momento de la transfección un 30-40% de confluencia, 24 h antes se sembraron 60.000-80.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos con 1ml de DMEM suplementado con FBS al 10%. Tres horas antes de la transfección se sustituyó el medio de crecimiento por DMEM. Una vez las células se estabilizaron, se transfetaron durante 24 h con siRNA específico para PPAR γ (*siRNA HP genomewide*, Qiagen-IZASA, Barcelona, España) y con un siRNA control sin homología con ARNs eucarióticos (*All stars negative control* Qiagen-IZASA), resuspendidos en un tampón específico para ARNs de interferencia (*siRNA resuspension buffer*, Qiagen-IZASA) a una concentración final de 5 nM, usando como agente transfectante *HiPerfect Transfection Reagent* (Qiagen-IZASA). Después se retiró el medio con el agente transfectante por DMEM con BSA al 0,1 % y las células fueron o no tratadas 18 h con pioglitazona y estimuladas 24 h con IL-1 β .

10. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm

La cuantificación de ARNm de los genes COX-2, PPAR γ , NOX-1 y catalasa se llevó a cabo en arterias mesentéricas de resistencia y en lisados celulares mediante RT-PCR, por el método de Chomczynski y Sacchi (1987) modificado.

Para la extracción de ARN de cultivos de CMLV y fibroblastos, una vez finalizados los distintos tratamientos a los que se sometieron las células, se retiró el medio de cultivo de las placas y se realizaron dos lavados en frío con PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺. Una vez eliminado el PBS, se añadió 1 ml de Trizol a cada pocillo y se lisaron las células, también en frío, pipeteando arriba y abajo varias veces. El Trizol, buffer específico para la extracción y preservación de ARN total en un solo paso, produce la ruptura de las células al disolver lípidos y precipitar proteínas, preservando la integridad del ARN. Para realizar la extracción del ARNm las arterias se homogeneizaron en frío con un Politrón (PT-2010, Kinematica AG, Lucerna, Suiza) a 10.000xg durante 10 min en 800 μ l de Trizol (Invitrogen). A continuación se recogieron los sobrenadantes, a los que se añadieron 200 μ l de cloroformo. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 12.000xg a 4°C durante 15 min. La adición de cloroformo junto con la centrifugación permite la separación de dos fases, una orgánica y otra acuosa, en la cual permanece el ARN.

Para precipitar el ARN total se añadieron 500 μ l de isopropanol y 10 μ g de glucógeno, cuya función es formar complejos con los ácidos nucleicos que permitan la formación de precipitados visibles y fácilmente manipulables. Esta mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se centrifugó posteriormente a 4°C a 12.000xg durante 30 min. Los precipitados se lavaron con 800 μ l de etanol al 75% preparado en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se centrifugaron a 7.500xg a 4°C para los homogenados arteriales y a 10.000xg para los lisados celulares (favoreciendo así la adhesión de precipitados al fondo del tubo evitando que se disgreguen). A continuación, se retiró el etanol y se dejaron secar los precipitados al aire asegurando la completa eliminación del alcohol, pues es un potente inhibidor de las siguientes reacciones enzimáticas a las que se someterán las muestras. Los precipitados se resuspendieron en 10-15 μ l de agua DEPC filtrada. La cuantificación del ARN total

extraído se calculó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta llevar a cabo la retrotranscripción.

Para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico, 1 µg del ARNm total fue tratado con ADNasa I (DNase I recombinant, RNase free, Roche, Mannheim, Alemania) y retrotranscrito a ADNc usando un kit comercial (High-Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems Hispania, Madrid, España), el cual usa una variante de alta eficacia y rendimiento de la enzima Multiscribe Reserve Transcriptase. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones comerciales en 20 µl de volumen de reacción. La mezcla se procesó en un termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) durante 10 min a 25°C y 2 h a 37°C. Se añadió un último paso a 70°C durante 5 min para inactivar la retrotranscriptasa. Finalizada la retrotranscripción, y asumida un 100% de eficacia en la conversión del ARN total a ADNc, los ADNc obtenidos se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando el sistema ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems Hispania), perteneciente al Centro de Apoyo Tecnológico (C.A.T.) de la Universidad Rey Juan Carlos, mediante sondas Taqman MGB ("*minor groove binder*"). Se realizaron curvas de concentración para determinar la cantidad de ADNc necesario de cada gen. Se amplificó un volumen final de 20 µl (20 ng para COX-2 y catalasa, 40 ng para NOX-1 y 100 ng para PPARγ) formado por 9 µl del ADNc y 11 µl de la mezcla de reacción. Esta mezcla consta de 10 µl de Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems Hispania) 2X con ROX como fluorocromo para control de carga de la mezcla y 1 µl de mezcla 20X de Sonda Taqman y el par de cebadores específicos para amplificar el gen de COX-2 (Rn00568225_m1), NOX-1 (Rn00586652_m1), catalasa (Rn00560930_m1) y PPARγ (Rn00440945_m1), diseñados por Applied Biosystems. Los resultados de amplificación fueron normalizados respecto a los datos obtenidos de la amplificación de genes cuya expresión es constante, independientemente de la situación experimental o de los tratamientos. Como control

endógeno se usó el gen de la β_2 -microglobulina (Rn00560865_m1). El programa de amplificación usado fue:

1. Incubación inicial: 50°C, 2 min.
2. Desnaturalización inicial: 95°C, 10 min.
3. 40 ciclos: 95°C, 15 seg y 60°C, 1 min.

11. INMUNOFLUORESCENCIA

La localización de COX-2 en la pared vascular se determinó por inmunofluorescencia en cortes transversales de segmentos de AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona. Para ello, los segmentos se fijaron con paraformaldehído 4% (PFA en 0,2 M PBS, pH=7,2-7,4) durante 1 h. Después se realizaron tres lavados consecutivos de 10 min con 0,1 M PBS y por último, se introdujeron en una solución de 0,1 M PBS y 30% sacarosa durante al menos 2 h. A continuación, los segmentos se sumergieron en medio de montaje OCT tissue-tek (Sakura Finetek Europe B.V., Flemingsweg, Holanda), hasta que el medio penetró uniformemente dentro del vaso. Finalmente, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta el día del experimento.

Con un criostato se hicieron cortes transversales de 14 μm de grosor y se montaron sobre portaobjetos gelatinados. Después de un periodo de secado de 60-90 min a 37°C, los portaobjetos se bloquearon con 0,1 M PBS, 0,4% Tritón X100 y 5% BSA durante 1 h a 37°C, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. El portaobjetos se secó con el fin de evitar la dilución del anticuerpo primario, tras lo cual las secciones se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de cabra anti-COX-2 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology Inc) diluido en 0,1 M PBS, 0,3% Tritón X100 y 2% BSA. A continuación, después de mantener los portaobjetos a 37°C durante 30 min, se realizaron 3 lavados de 10 min en 0,1 M PBS, 0,3% Tritón X100 y 2% BSA y, posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti-cabra (1:200) conjugado con Alexa Fluor (1:200) (Invitrogen-Molecular Probes) durante 1 h a 37°C. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara húmeda.

La fluorescencia se visualizó con un microscopio confocal invertido Leica TCS SP2 con un objetivo de inmersión de 63X. El componente autofluorescente del anticuerpo

conjugado con Alexa Fluor se visualizó por excitación a $\lambda=568$ nm y emisión a $\lambda=600-700$ nm. La especificidad de la señal se evaluó en muestras en las que se omitía el anticuerpo primario y que se procesaron como está indicado anteriormente. En estas condiciones no se observó tinción en la pared vascular en ninguna de las situaciones experimentales.

12. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

Los niveles de anión superóxido fueron cuantificados por medio del análisis de la emisión de fluorescencia en imágenes obtenidas por microscopía confocal, usando el método del dihidroetidio (DHE), como previamente se ha descrito (Jiménez-Altayó y cols., 2006). La hidroetidina es capaz de atravesar libremente las membranas celulares y oxidarse en presencia de O_2^- transformándose en bromuro de etidio, el cual queda atrapado en el interior celular debido a su capacidad para intercalarse en el ADN. El bromuro de etidio se excita a 488 nm de longitud de onda y emite una fluorescencia roja a 600-700 nm. Así, con este método, se puede analizar la producción “*in situ*” de O_2^- .

Después de extraer y limpiar las terceras ramas de las AMR se mantuvieron en KHS con sacarosa al 30% durante 1 h. A continuación se congelaron en medio OCT tissue-tek y se mantuvieron las muestras a -80°C hasta el día del experimento. Se realizaron cortes transversales de 14 μm de grosor con un criostato, que se recogieron en portaobjetos gelatinados y se secaron en una estufa a 37°C durante 1-2 h aproximadamente. Después se realizó un lavado de los portaobjetos con solución Krebs-HEPES (119 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1,2 mM CaCl_2 ; 0,4 mM KH_2PO_4 ; 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mM NaHCO_3 ; 11,1 mM Glucosa; 20 mM HEPES, pH=7,4) y posteriormente se incubaron durante 30 min a 37°C en oscuridad con Krebs-HEPES conteniendo DHE (10 μM) en una cámara húmeda. Después de la incubación, la fluorescencia emitida por los anillos se visualizó con un microscopio confocal Leica TCS SP2, usando un objetivo de inmersión de 40X.

Cada día se analizaron en paralelo arterias de WKY y SHR tratadas y no tratadas con pioglitazona, usando las mismas condiciones de captura de imágenes. Para la cuantificación, se captaron 3 o 4 anillos por cada animal para cada condición

experimental y se calculó el valor medio de fluorescencia en la pared vascular usando el software de análisis de imagen Metamorph para PC (Molecular Devices Corp.). La producción de anión superóxido en SHR y el efecto de pioglitazona sobre dicha producción se analizaron asignando el valor 1 a la intensidad de fluorescencia obtenida en la cepa normotensa.

Para llevar a cabo la detección de anión superóxido en CMLV, éstas se sembraron y crecieron sobre cristales situados en el interior de placas de 6 pocillos. Alcanzada una confluencia del 60-80%, las células fueron ayunadas durante 24 h y posteriormente estimuladas con IL-1 β (10 ng/ml) durante 24 h, en presencia y ausencia de la preincubación durante 18 h con pioglitazona (10 μ M). Como situación control se utilizaron cultivos celulares no estimulados. Transcurrido el periodo de tratamiento, se incubaron con DHE (10 μ M) disuelto en medio DMEM al 0,1% de BSA durante 30 min a 37°C. La fluorescencia fue detectada usando un objetivo de inmersión de 40X en un microscopio confocal Leica TCS SP5, equipado con un láser kriptón/argón (Wetzlar, Alemania).

Cada día se analizaron en paralelo células en situación control, estimuladas con IL-1 β en ausencia o presencia de pioglitazona, utilizando los mismos parámetros de intensidad y voltaje.

Se cuantificaron los valores de la intensidad de fluorescencia de 10-15 núcleos por experimento e imagen usando el software de análisis de imagen Metamorph para PC. Para analizar si la IL-1 β incrementaba la producción de anión superóxido se asignó el valor 1 a la fluorescencia en ausencia de estímulo (control). El efecto de pioglitazona sobre la producción de anión superóxido inducida por IL-1 β se analizó asignando el valor 1 a la intensidad de fluorescencia obtenida en CMLV estimuladas con la citoquina en ausencia de tratamiento.

12.1. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO POR LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA EN CULTIVOS DE CMLV

La actividad de la NAD(P)H oxidasa vascular se midió por la quimioluminiscencia emitida por la reacción entre la lucigenina y $O_2^{\cdot-}$, de acuerdo con el procedimiento descrito por San José y cols. (2009), con ligeras modificaciones. La lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) es un compuesto aromático que puede reducirse por $O_2^{\cdot-}$ produciendo emisión de luz que puede ser detectada en un luminómetro.

Las células estimuladas con IL-1 β durante 24 h con o sin el pretratamiento de 18 h con PPAR γ pioglitazona, fueron homogeneizadas con un buffer que contenía 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA y 150 mM sacarosa, pH=7,0. Como situación control se utilizaron cultivos celulares no estimulados.

La reacción comienza al añadir a la muestra proteica una mezcla de lucigenina (5 μ M) y NAD(P)H (0,1 mM) en un volumen final de 300 μ l. El luminómetro de tubo Sirius (Berthold Detection System, Sirius, Pforzheim, Alemania) se programó para registrar el desarrollo de la quimioluminiscencia en términos de unidades relativas de luz (URL) emitidas a intervalos de 2,4 seg durante 5 min. La emisión específica de luz se calculó después de sustraer a cada lectura la actividad de fondo, que se determinó en viales que contenían todos los componentes excepto el homogenado proteico, que se reemplazó por el buffer de lisis en el que están tratadas las muestras. Se usó el valor del área bajo la curva para cuantificar la quimioluminiscencia y los datos se expresaron como URL por segundo (URL/s).

Para verificar la especificidad del ensayo de lucigenina por la producción de $O_2^{\cdot-}$, en experimentos previos, San José y cols. (2009) examinaron el efecto del barredor enzimático de $O_2^{\cdot-}$ SOD (100 U/ml), el cual abolió la señal.

13. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H_2O_2

Para determinar la producción de H_2O_2 en CMLV se utilizó el método de la diclorofluoresceína. El diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína (DFC-DA) es un colorante permeable no fluorescente capaz de difundir a través de la membrana celular. En el

interior celular es degradado por las esterasas intracelulares a 2'-7' diclorofluoresceína, que se une al H₂O₂ intracelular y emite fluorescencia a una longitud de onda de 535 nm cuando se excita con una longitud de onda de 485 nm. El DCF-DA localizado en el exterior celular no será capaz de reaccionar con el H₂O₂, limitando la detección al H₂O₂ intracelular. Este método permite una cuantificación rápida y precisa de especies reactivas de oxígeno en presencia de un estímulo que active el metabolismo oxidativo.

Para llevar a cabo la detección de la producción de H₂O₂ en CMLV, se sembraron las células en placas de 24 pocillos en DMEM con FBS al 10% en número suficiente para tener al día siguiente un 50-60% de confluencia. El día siguiente a la siembra, se ayunaron los cultivos de CMLV durante 24 h. La producción de H₂O₂ se midió en situación control y tras 24 h de estimulación con IL-1 β (10 ng/ml).

Para analizar el efecto de la activación de PPAR γ sobre la producción de H₂O₂ las células se incubaron con pioglitazona (10 μ M) 18 h antes de ser estimuladas con IL-1 β . La participación de la NAD(P)H oxidasa vascular en la producción de H₂O₂ se analizó utilizando apocinina (30 μ M), y para determinar la sensibilidad y especificidad del método se utilizó catalasa (1000 U/ml); estos fármacos se administraron 18 h antes del tratamiento con IL-1 β . A continuación, se añadió a los pocillos DCF-DA (10 μ M) disuelto en DMEM suplementado con BSA al 0,1%, se cubrió la placa para protegerla de la luz y se introdujo en el incubador a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se procedió a lavar la placa tres veces con PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. Posteriormente, se añadió en cada pocillo y en oscuridad 500 μ l de NaOH 1M filtrado. La placa protegida de la luz se incubó a temperatura ambiente y se mantuvo en agitación continua durante 30 min. Posteriormente se transfirieron 200 μ l de cada pocillo a una placa de 96 pocillos opaca, específica para la cuantificación de fluorescencia (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) y se procedió a medir la fluorescencia en un espectrofluorímetro (SPECTRAFluor Plus, Tecan Ibérica, Barcelona, España). Los datos de fluorescencia para la cuantificación de H₂O₂ se registraron y procesaron con el software asociado al espectrofotómetro "XFLUOR-4 v.4.50" para PC. El efecto de los fármacos apocinina y catalasa sobre la producción de

H₂O₂ inducida por IL-1 β se analizó asignando el valor 1 a la intensidad de fluorescencia obtenida en CMLV estimuladas con la citoquina en ausencia de tratamiento.

14. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROSTANOIDES E ISOPROSTANOS

Para cuantificar la producción de prostanoideos, las arterias del lecho mesentérico fueron incubadas durante 3 h en KHS a 37°C burbujeando con carbógeno para simular las condiciones de los experimentos de reactividad vascular. Tras este período de incubación, se administraron sucesivas concentraciones de fenilefrina (0,1-30 μ M). El KHS se recogió para realizar la medida de los prostanoideos, mientras que las arterias se recogieron para medir la concentración de proteínas. Ambas se congelaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

La producción de PGF_{2 α} y de PGI₂ fue evaluada por la cuantificación de sus metabolitos estables 13,14-dihidro-15-ceto-PGF_{2 α} y 6-ceto-PGF_{1 α} , respectivamente. La cuantificación, tanto de los prostanoideos como del 8-isoprostano, se realizó mediante enzimoimmunoensayo con kits comerciales de Cayman Chemical. El ensayo está basado en la competición entre el prostanoide presente en la muestra que se quiere analizar y el mismo prostanoide conjugado con la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y cuya concentración es conocida, denominado prostanoide "Tracer". La muestra estudio, una muestra estándar, el prostanoide "Tracer" y el antisuero específico se añadieron a pocillos de una placa antigenada con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-conejo IgG. La cantidad de prostanoide conjugado al enzima que se una al antisuero será inversamente proporcional a la cantidad de prostanoide libre de la muestra (Fig. 35). La enzima conjugada con el prostanoide reaccionará con uno de los reactivos comerciales [Ellman's Reagent, agente formado por acetilcolina y 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)]. La hidrólisis de la acetilcolina por AChE produce tiocolina y la reacción no enzimática de esta tiocolina con 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico) produce 5-tio-2-ácido nitrobenzoico, compuesto coloreado que se puede leer a una longitud de onda de 405-420 nm. De esta manera, la intensidad de color de los pocillos será inversamente proporcional a la concentración de prostanoideos libres en la muestra. La

absorbancia se midió en un espectrofotómetro (SPECTRAFluor Plus). Para determinar la concentración de cada una de las muestras, se extrapolaron los resultados de densidad óptica en la curva patrón realizada durante el experimento. Finalmente, la concentración de prostanoide de cada muestra se normalizó por la cantidad de proteínas.

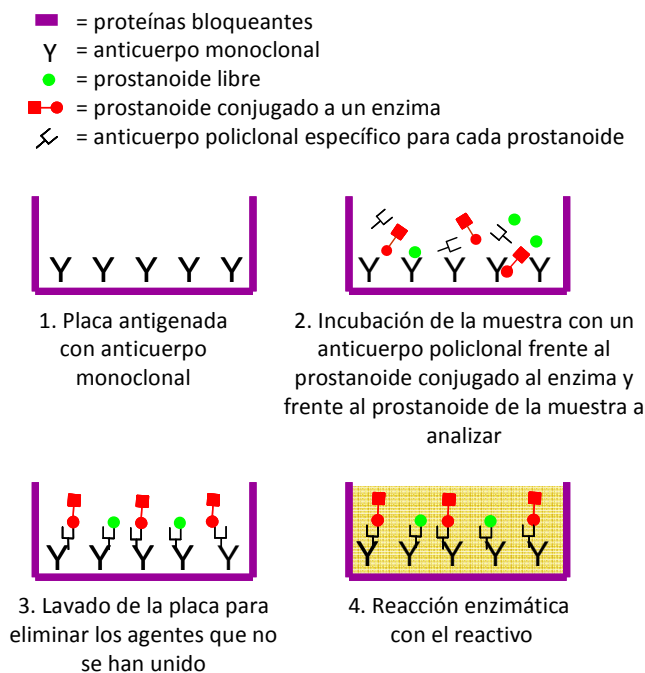


Fig. 35: Esquema representativo del proceso del enzoinmunoensayo.

15. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN PLASMA

Los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, de manera que su concentración sérica es proporcional a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados oxidados y, por tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica. Los niveles de MDA plasmáticos fueron medidos por un ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Rodríguez-Martínez y Ruiz-Torres, 1992). Para ello, se mezcló el plasma con tricloroacético (20%) en 0,6 M HCl (1:1, v/v) y los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 min para precipitar los componentes del plasma y evitar posibles interferencias. Las muestras se centrifugaron a 1.500xg durante 15 min antes de añadir

al sobrenadante TBA (120 mM en Tris 260 mM, pH=7) (Sigma Chemical Co.) en una proporción de 1:5 (v/v); la mezcla se hirvió a 97°C durante 30 min. La reacción entre el MDA y el TBA produce un pigmento estable de color rojo en una proporción 1:2 (MDA:TBA), con un coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en el espectro visible (535 nm). Las medidas espectrofotométricas se realizaron a 20°C.

16. EXPRESIÓN DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA

La tensión activa que experimenta el vaso tras los distintos estímulos se calculó como el cambio producido en la fuerza de la pared del vaso dividido por dos veces la longitud del segmento arterial. Las respuestas vasoconstrictoras inducidas por fenilefrina e iloprost se expresan como porcentaje de la respuesta al K^+ -KHS. Las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh e iloprost se expresaron en porcentaje del tono previo en cada caso.

Los datos de expresión de proteínas se expresaron como la relación entre las densidades de las bandas del inmunoblot de la proteína a estudiar y de la proteína control, TBP para los extractos nucleares, IKK para la forma fosforilada de la quinasa que fosforila a la proteína inhibitoria del factor NF- κ B, p-IKK, β -actina para COX-2 en fibroblastos y α -actina para el resto de las muestras. En el caso del ARNm, se utilizó Ciclofilina D en los experimentos de transfección de siRNA y β_2 -microglobulina en el resto como controles endógenos para corregir los valores de expresión obtenidos por la cantidad de carga de ADNc. Los datos de expresión de proteína o ARNm se calcularon como la expresión relativa en muestras de un grupo experimental con respecto a la de las muestras del grupo control con el que se quiere comparar. En el ARNm, para calcular el índice de expresión relativa se usó el método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar (ES) de la media. El número de experimentos (n) corresponde al número de ratas utilizadas en el caso de los experimentos en AMR, y de distintos cultivos y pases en el caso de cultivos de CMLV o fibroblastos. Las diferencias entre medias se analizaron mediante *t* test de Student no pareada o pareada, como se indica en cada caso. Las diferencias entre curvas

concentración-respuesta se estudiaron mediante ANOVA de dos vías seguido por análisis de Bonferroni. Se consideró significativo un valor de probabilidad menor del 5% ($p < 0,05$).

17. SOLUCIONES Y FÁRMACOS UTILIZADOS

Los fármacos se prepararon como soluciones concentradas (100 ó 10 mM) disueltas en agua milli-Q y mantenidas en el congelador a -20°C . Los fármacos no disueltos en agua fueron: indometacina, disuelta en solución de bicarbonato sódico (0,5% p/v), NS 398, SC 19220, RO 1138452, alopurinol, 15-PGJ₂, rosiglitazona y pioglitazona disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), SQ 29,548 y fenofibrato disueltos en etanol absoluto. Se realizaron pruebas para comprobar que estos solventes no modificaban las respuestas vasomotoras ni la expresión de proteínas o ARNm en nuestros experimentos. Cada día del experimento se preparaban las diluciones necesarias a partir de las concentradas.

Los productos utilizados han sido:

Acetilcolina, hidrocloreuro (Sigma Chemical Co)

Ácido etilendiamintetracético (EDTA) (Sigma Chemical Co)

Ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) (Sigma Chemical Co)

Ácido tiobarbitúrico (4-6-Dihidroxipirimidina-2-tiol) (Sigma Chemical Co)

Acrilamida (N, N'- metilen-bis-acrilamida 30%, solución 29:1, 3,3% C) (BioRad)

Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma Chemical Co)

Alopurinol (Research Biochemicals Incorporated, RBI, Natick, MA, USA)

Apocinina (4'-Hidroxi-3'-metoxiacetofenona) (Fluka, Sigma Chemical Co)

Azul de bromofenol (3'3'', 5'5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódica) (Sigma Chemical Co)

Buffer Salino Fosfato (PBS) con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Invitrogen-Gibco)

Buffer Salino Fosfato (PBS) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (Invitrogen-Gibco)

Carboximetilcelulosa, sal sódica (Sigma Chemical Co)

Catalasa (Sigma Chemical Co)

Cloroformo (Merck, Darmstadt, Alemania)

Colagenasa Tipo II (Invitrogen-Gibco)

Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína (Sigma Chemical Co)

Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma Chemical Co)

Dihidroetidio (Molecular Probes, Invitrogen)

Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck)

DMEM con glutamina, piruvato y 1 g/L de glucosa (Invitrogen-Gibco)

Dodecil sulfato sódico (SDS) (BioRad)

Etanol (96% volumen/volumen, Merck)

Fenilefrina (Sigma Chemical Co)

Fenofibrato (Sigma Chemical Co)

Furegrelato (ácido 5-(3-piridinilmetil)-2-benzofurancarboxílico, sal de sodio) (Sigma Chemical Co)

Gelatina (Sigma Chemical Co)

Glicerol (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España)

Glicina (Sigma Chemical Co)

Glucógeno (Sigma Chemical Co)

Hepes (Sigma Chemical Co)

Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac)

Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co)

Indometacina (ácido 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1-H-indol-3-acético) (Sigma Chemical Co)

Iloprost (Cayman Chemical)

Interleuquina 1 β recombinante de ratón (Sigma Chemical Co)

Isopropanol (Merck)

Leche desnatada (Sveltesse, Nestlé, Vevey, Suiza)

L-NAME (N^w-Nitro-L-Arginina metil éster) (Sigma Chemical Co)

Lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) (Sigma Chemical Co)

Metanol (Sigma Chemical Co)

NAD(P)H (β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, sal tetrasódica) (Sigma Chemical Co)

NS 398 (N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Calbiochem)

OCT tissue-tek (Sakura)

Ortovanadato sódico (Sigma Chemical Co)

Paraformaldehído (Panreac)

Penicilina/Estreptomina (Invitrogen-Gibco)

Peróxido de hidrógeno (30% peso/peso, H₂O₂) (Sigma Chemical Co)

Persulfato amónico (APS) (Sigma Chemical Co)

Pioglitazona (generosamente suministrado por Lilly Spain y Takeda)

Polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween 20) (BioRad)

Reactivo de Bradford (Sigma Chemical Co)

RO 1138452 (4,5-dihidro-N-[4-[[4-(1-metiletoxi)fenil]metil]fenil]-1H-imadazol-2-amina) (Cayman Chemical)

Rosiglitazona maleato (Alexis Biochemicals, Farmingdale, NY, USA)

Sacarosa (Merck)

SC 19220 (ácido 2-acetilhidrazida 10(11H)-carboxílico) (Sigma Chemical Co)

SQ 29,548 ([ácido 1S-[1. α ,2. α .(Z),3. α ,4. α .]-7-[3-[[2-[(fenilamino) carbonil] hidrazino] metil] -7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-5- heptenoico) (ICN Ibérica S.A.)

Suero bovino fetal (FBS) (Reactiva)

SYLGARD (Silicone elastómero) (Dow Corning Corporation, Midland, MI, USA)

Temed (N,N,N',N'-tetra-metil-etilenodiamina) (Sigma Chemical Co)

Tempol (4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina 1-oxil) (Fluka)

Tranilcipromina (Sigma Chemical Co)

Tripsina-EDTA (Invitrogen-Gibco)

Tris (hidroximetil)-aminometano (Tris) (Sigma Chemical Co)

Tritón X100 (Sigma Chemical Co)

Trizol (Invitrogen Life Technologies)

β -mercaptoetanol (BioRad)

15-deoxi-delta-12, 14- prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) (Calbiochem)

RESULTADOS

1. TRATAMIENTO AGUDO CON AGONISTAS PPAR γ DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

1.1. EFECTO DE IL-1 β SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2

En condiciones basales no se encontraron diferencias en la expresión de la proteína COX-2 entre cultivos de CMLV procedentes de animales normotensos e hipertensos. Tras 24 h de incubación con la citoquina proinflamatoria IL-1 β (10 ng/ml), la expresión de COX-2 se incrementó significativamente, siendo este incremento mayor en cultivos de SHR que de WKY (Fig. 36). Previos resultados de nuestro grupo mostraron que en condiciones basales tampoco se encuentran diferencias en la expresión del ARNm de COX-2 entre WKY y SHR, mientras que tras la estimulación con IL-1 β durante 24 h los niveles de ARNm de COX-2 son superiores en cultivos de SHR comparados con los procedentes de WKY (Pérez Girón, 2009).

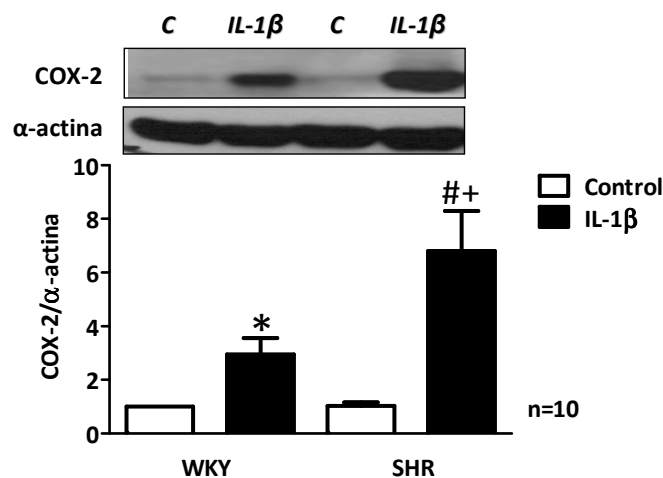


Fig. 36: Expresión de la proteína COX-2 por Western Blot en cultivos de CMLV de aorta de ratas WKY y SHR estimulados durante 24 h con IL-1 β (10 ng/ml). La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY control. * $p < 0,05$ vs WKY control por t de Student pareada; # $p < 0,05$ vs SHR control por t de Student pareada y + $p < 0,05$ vs WKY IL-1 β por t de Student no pareada. n indica el número de experimentos.

1.2. EFECTO DE IL-1 β SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El estrés oxidativo juega un papel importante en la patofisiología de la hipertensión. Por ello, en cultivos de CMLV de aortas de ratas WKY y SHR, analizamos la expresión proteica de la subunidad catalítica de la NAD(P)H oxidasa localizada en la membrana plasmática de CMLV, NOX-1, la actividad del enzima NAD(P)H oxidasa, principal fuente vascular de producción de anión superóxido y la producción de O₂⁻ y de H₂O₂.

1.2.1. Efecto de IL-1 β sobre la expresión de NOX-1

En cultivos de CMLV de WKY y SHR, el tratamiento con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) incrementó los niveles de la proteína NOX-1 (Fig. 37). Este incremento fue similar en cultivos de ambos tipos celulares (WKY: 61 \pm 16 %, n=7; SHR: 68 \pm 12 %, n=13; p>0,05).

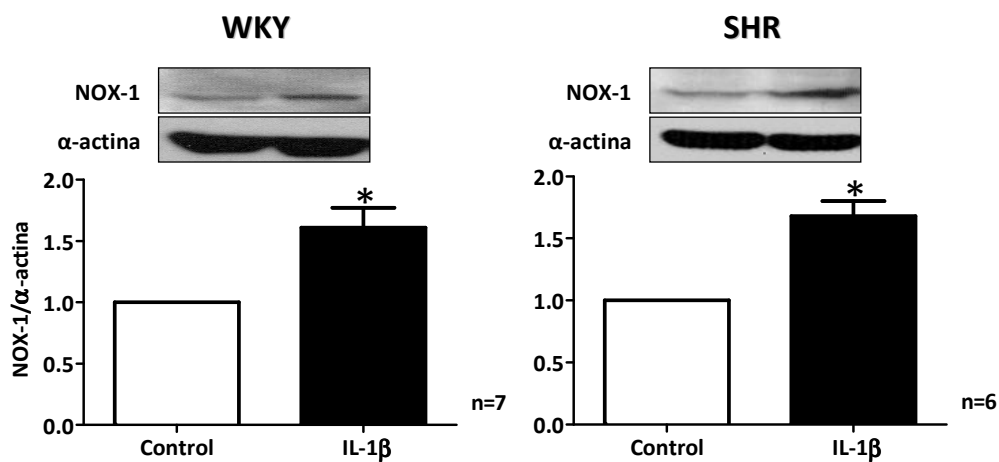


Fig. 37: Efecto del tratamiento durante 24 h con IL-1 β (10 ng/ml) sobre la expresión de NOX-1 en cultivos de CMLV procedentes de aorta de ratas WKY y SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como media \pm ES respecto a su control. *p<0,05 por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.2.2. Efecto de IL-1 β sobre la actividad NAD(P)H oxidasa

La actividad basal de la NAD(P)H oxidasa fue mayor en CMLV de SHR comparado con WKY (Fig. 38).

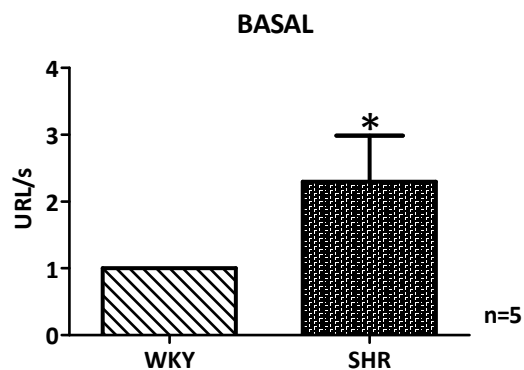


Fig. 38: Actividad basal de la NAD(P)H oxidasa en cultivos de CMLV procedentes de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de luz por segundo (URL/s) respecto a WKY. * $p < 0,05$ por *t* de Student no pareada. n indica el número de experimentos.

Cuando se analizó el efecto de la incubación con IL-1 β durante 24 h, se observó un incremento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa, tanto en cultivos de CMLV procedentes de ratas WKY como de ratas SHR (Fig. 39). Este incremento fue mayor en cultivos de animales normotensos (WKY: 174 \pm 43 %, n=15; SHR: 37 \pm 15 %, n=10; $p < 0,05$), de manera que tras el estímulo con la citoquina, la actividad de la NAD(P)H oxidasa fue similar en ambas cepas (Fig. 40).

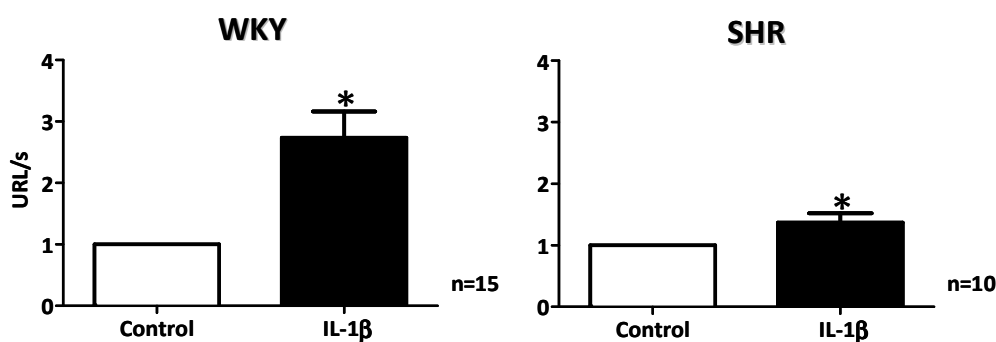


Fig. 39: Efecto de 24 h de tratamiento con IL-1 β (10 ng/ml) sobre la actividad de la NAD(P)H oxidasa en cultivos de CMLV procedentes de ratas WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de luz por segundo (URL/s) respecto a su situación control. * $p < 0,05$ por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

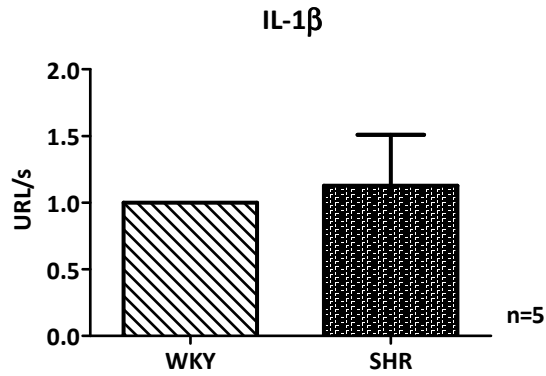


Fig. 40: Actividad NAD(P)H oxidasa en cultivos de CMLV procedentes de ratas WKY y SHR tras el tratamiento durante 24 h con IL-1 β (10 ng/ml). Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de luz por segundo (URL/s) respecto a WKY. n indica el número de experimentos.

1.2.3. Efecto de IL-1 β sobre la producción de O $_2^{\cdot-}$

El tratamiento con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) incrementó la producción de O $_2^{\cdot-}$ tanto en cultivos de CMLV de WKY como de SHR (Fig. 41) (WKY: 105 \pm 22 %, n=3; SHR: 60 \pm 11 %, n=5; p>0,05).

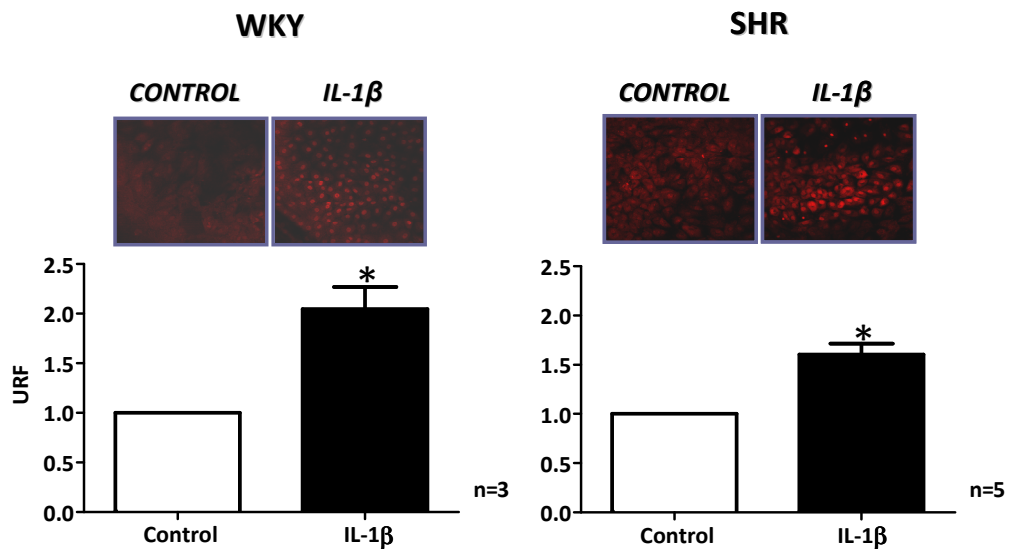


Fig. 41: Efecto del tratamiento con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) sobre la fluorescencia emitida por dihidroetidido en CMLV de ratas WKY y SHR. En la parte superior se muestran imágenes representativas. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal (objetivo 40X). Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF) respecto a su situación control. *p<0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos. Tamaño de la imagen 387,5 x 387,5 μ m.

1.2.4. Efecto de IL-1 β sobre la producción de H₂O₂

En CMLV de ratas normotensas el tratamiento durante 24 h con IL-1 β no modificó la producción de H₂O₂. Sin embargo, en CMLV de SHR se observó un incremento significativo en la producción de H₂O₂ tras el tratamiento con IL-1 β (Fig. 42).

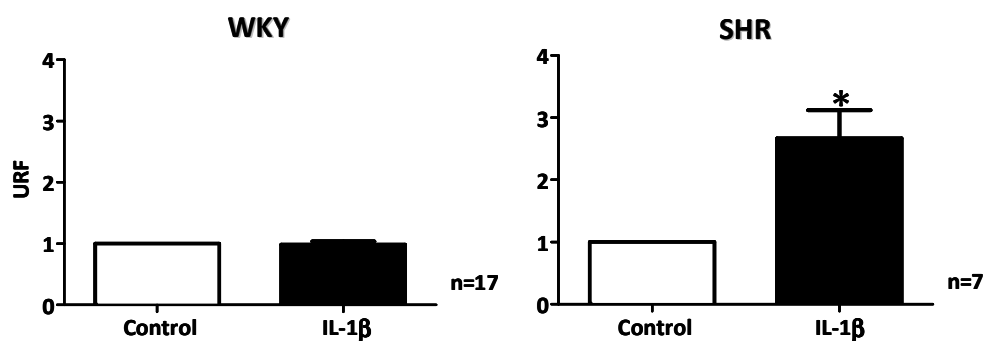


Fig. 42: Efecto del tratamiento con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) sobre la producción de H₂O₂ en cultivos de CMLV procedentes de ratas WKY y SHR, cuantificado por el método de la diclorofluoresceína. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF) respecto a su situación control. * $p < 0,05$ por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

El tratamiento previo con apocinina (30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) redujo el incremento en la producción de H₂O₂ inducido por IL-1 β en SHR (Fig. 43), lo que sugiere que en estas condiciones la producción de H₂O₂ procede, al menos en parte, de la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa. La especificidad del método se determinó incubando con catalasa (1000 U/ml, 18 h antes de IL-1 β), un barredor de peróxido de hidrógeno, que redujo el incremento en la producción de H₂O₂ inducido por IL-1 β .

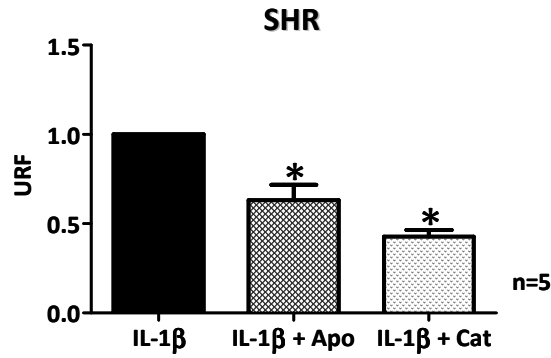


Fig. 43: Efecto del tratamiento previo con apocinina (Apo, 30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la producción de H₂O₂ inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV procedentes de ratas SHR, cuantificado por el método de la diclorofluoresceína. Se utilizó el tratamiento con catalasa (Cat, 1000 U/ml, 18 h antes de IL-1 β) como control de la especificidad del método. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF) respecto a IL-1 β . * $p < 0,05$ vs IL-1 β por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

Los resultados mostrados en este apartado indican que en CMLV de SHR la IL-1 β aumenta la producción vascular de O₂⁻ y de H₂O₂, al menos en parte, por aumentar la actividad de la NAD(P)H oxidasa, mientras que en la cepa WKY sólo se observa un aumento en la producción de O₂⁻.

1.3. PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL EFECTO DE IL-1 β SOBRE COX-2

Una vez determinado que IL-1 β produce aumento de ROS, analizamos su participación en el efecto de IL-1 β sobre la expresión de COX-2. En primer lugar se estudió la participación de las principales fuentes de O₂⁻ a nivel vascular, la NAD(P)H oxidasa y la xantina oxidasa. Para ello, preincubamos los cultivos de CMLV de ratas WKY y SHR con apocinina o con alopurinol, respectivos inhibidores de la NAD(P)H oxidasa y de la xantina oxidasa. Además, analizamos el efecto de la catalasa, enzima que detoxifica el H₂O₂. En cultivos de CMLV procedentes de aortas de ratas WKY y SHR, el tratamiento previo con apocinina (30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) redujo la expresión proteica de COX-2 inducida por IL-1 β (Fig. 44).

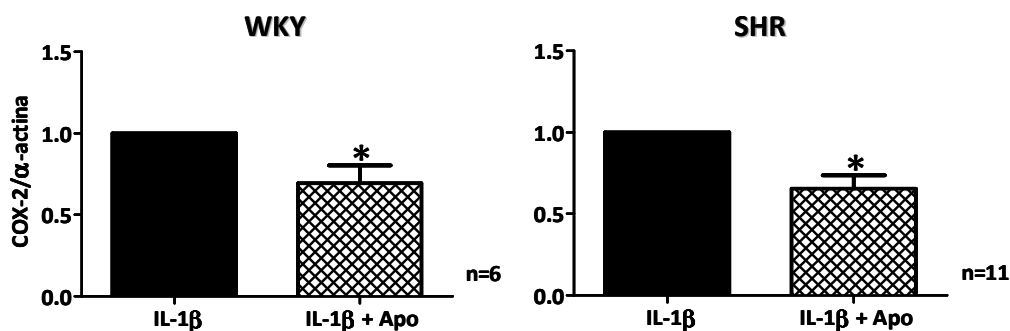


Fig. 44: Efecto del tratamiento previo con apocinina (Apo, 30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresi3n de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h). La expresi3n se normaliz3 utilizando α -actina. Los resultados se expresan como media \pm ES respecto a IL-1 β . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el n3mero de experimentos.

El tratamiento previo de CMLV de ratas WKY y SHR con alopurinol (100 μ M, 18 h antes de IL-1 β) tambi3n redujo los niveles de COX-2 inducidos por IL-1 β en ambos tipos celulares (Fig. 45).

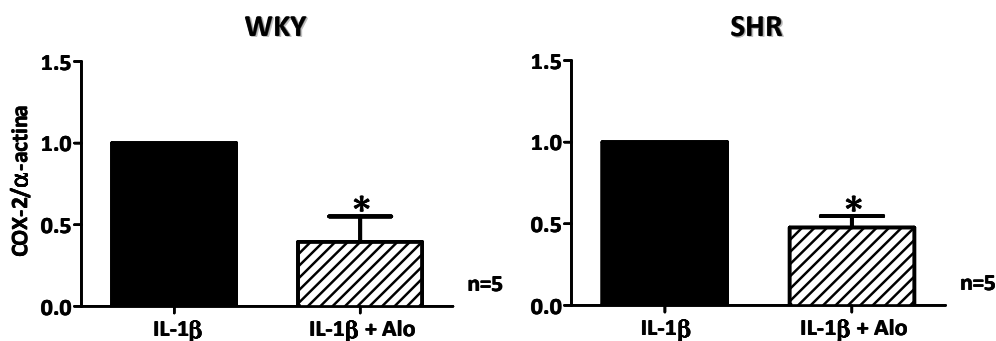


Fig. 45: Efecto del tratamiento previo con alopurinol (Alo, 100 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresi3n de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h). La expresi3n se normaliz3 utilizando α -actina. Los resultados se expresan como media \pm ES respecto a IL-1 β . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el n3mero de experimentos.

El tratamiento previo con catalasa (1000 U/ml, 18 h antes de IL-1 β) redujo la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β sólo en cultivos de CMLV procedentes de SHR, confirmando la participación del H₂O₂ en el aumento de la expresión de COX-2 inducido por esta citoquina proinflamatoria únicamente en células de animales hipertensos (Fig. 46).

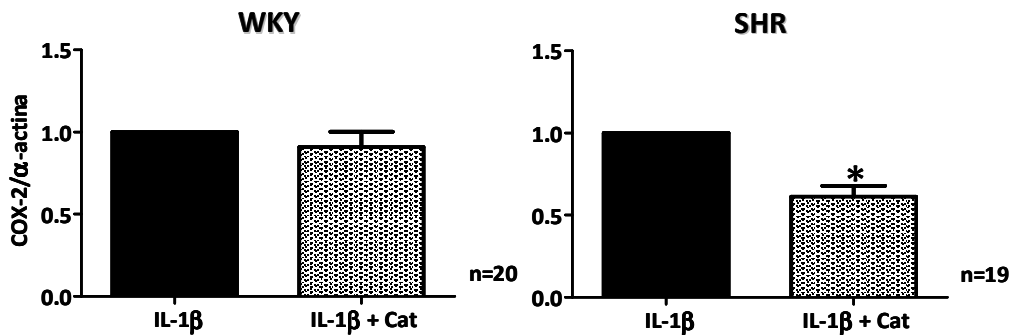


Fig. 46: Efecto del tratamiento previo con catalasa (Cat, 1000 U/ml, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h). La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como media \pm ES respecto a IL-1 β . * $p < 0,05$ por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

Los resultados mostrados sugieren la relación entre la producción de anión superóxido, al menos en parte, por la activación de la NAD(P)H oxidasa y/o xantina oxidasa y el incremento en la expresión de COX-2 inducido por IL-1 β en ambas cepas. Además, en células de animales hipertensos, el incremento de H₂O₂ contribuye específicamente a la incrementada expresión de COX-2 inducida por IL-1 β . Por esto nos propusimos analizar en la cepa SHR los mecanismos implicados en ese aumento de COX-2 inducido por ROS tras el estímulo con IL-1 β .

1.4. EFECTO DE H₂O₂ SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2

Una vez demostrada la participación de H₂O₂ en la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en SHR quisimos comprobar si la adición exógena de esta ROS inducía efectivamente la expresión de COX-2. La incubación con H₂O₂ (1-50 μ M) durante 90 min incrementó de forma concentración-dependiente la expresión de la proteína COX-2 en cultivos de SHR (Fig. 47A). Previamente se realizó una curva con diferentes concentraciones de H₂O₂ (1-50 μ M) a diferentes tiempos (90 min-4 h), observándose toxicidad a las 4 h de exposición al fármaco. Los siguientes experimentos se realizaron estimulando con 50 μ M H₂O₂ durante 90 min (Fig. 47B).

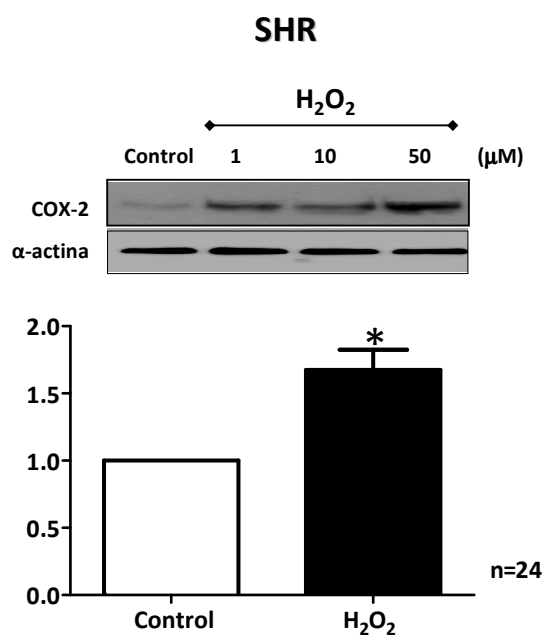


Fig. 47: A) Blot representativo del efecto de H₂O₂ (1-50 μ M, 90 min) sobre la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. B) Efecto del tratamiento durante 90 min con H₂O₂ (50 μ M) sobre la expresión de COX-2. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como media \pm ES respecto al control. * $p < 0,05$ por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.5. PARTICIPACIÓN DE NF- κ B EN LA EXPRESIÓN DE COX-2

Se ha descrito que las ROS contribuyen al estado inflamatorio crónico asociado a la patología hipertensiva (Pauletto y Rattazzi, 2006) ya que, como hemos comentado, activa factores de transcripción redox-sensibles como NF- κ B (Paravicini y Touyz, 2006) y, por lo tanto, la actividad de genes que están bajo su control, entre ellos COX-2 (Jaimes y cols., 2005). El tratamiento de CMLV de SHR con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h), incrementó la expresión de la subunidad p65 de NF- κ B en la fracción nuclear (Fig. 48), sin modificar su expresión en la fracción citosólica (resultados no mostrados). Este incremento se previno mediante el tratamiento previo con apocinina (30 μ M, 18 h antes de IL-1 β), confirmando que ese aumento se debía, al menos en parte, al aumento de ROS.

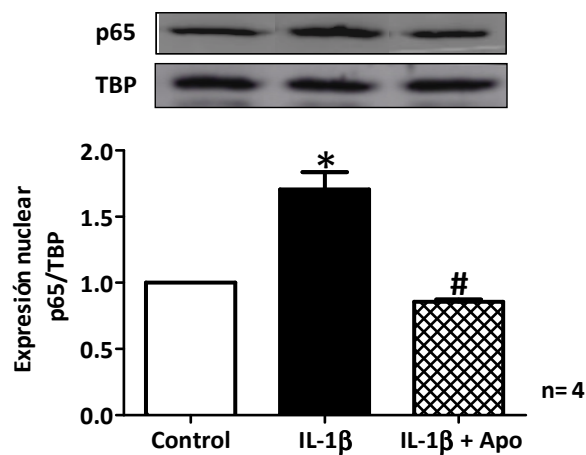


Fig. 48: Efecto de IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en ausencia y presencia de apocinina (Apo, 30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de p65 en extractos nucleares de cultivos de CMLV de SHR. La expresión se normalizó utilizando TBP. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a la situación control. * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs IL-1 β por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

IL-1 β también incrementó la expresión de la proteína p-IKK, quinasa que fosforila e inactiva a la proteína inhibitoria del factor NF- κ B (I κ B), provocando que se separe de NF- κ B y permitiendo así la translocación al núcleo del factor de transcripción. Este efecto se previno mediante el tratamiento previo con apocinina (30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) (Fig. 49), confirmando de nuevo que las ROS están implicadas en la activación de NF- κ B.

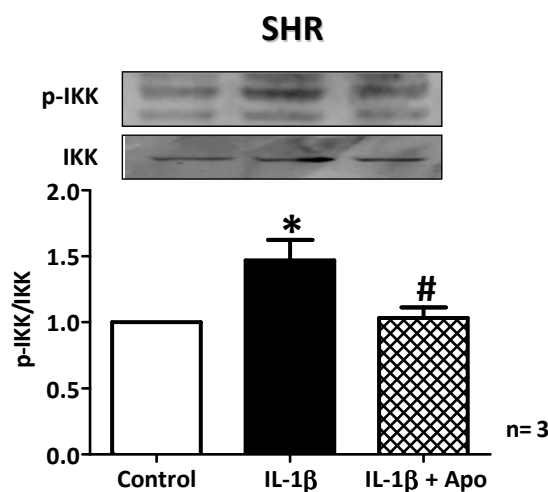


Fig. 49: Efecto de IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en ausencia y presencia de apocinina (Apo, 30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de p-IKK en extractos nucleares de cultivos de CMLV de SHR. La expresión se normalizó utilizando IKK. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a la situación control. * $p < 0,05$ vs control y # $p < 0,05$ vs IL-1 β por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

Puesto que IL-1 β aumenta la activación de NF- κ B, quisimos comprobar si este factor de transcripción estaba implicado en el aumento de los niveles de ARNm de COX-2 inducido por IL-1 β . Para ello, las células se trataron durante 18 h antes de la estimulación con IL-1 β con 10 μ M de lactacistina, un inhibidor del proteasoma, observándose en estas condiciones una reducción de la expresión del ARNm de COX-2 inducida por IL-1 β (Fig. 50).

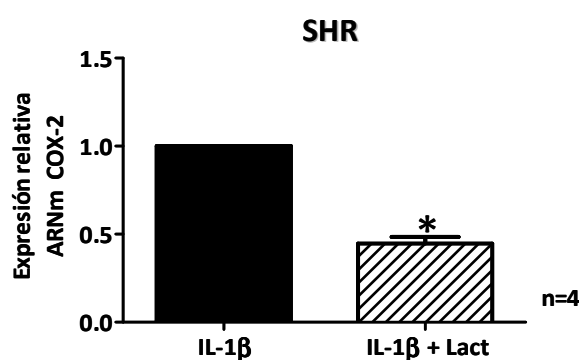


Fig. 50: Efecto del tratamiento previo con lactacistina (Lact, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre los niveles de ARNm de COX-2 inducidos por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV de aorta de ratas SHR. La expresión se normalizó utilizando β_2 -microglobulina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . * $p < 0,05$ por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

Puesto que habíamos demostrado la participación de H_2O_2 en la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en SHR, analizamos si la activación de NF- κ B estaba también implicada en el aumento de la expresión de COX-2 inducida por la adición exógena de H_2O_2 . Después del tratamiento previo durante 18 h con 10 μ M de lactacistina, y al igual que ocurría con la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β , se observó una reducción de la expresión de COX-2 inducida por H_2O_2 (Fig. 51).

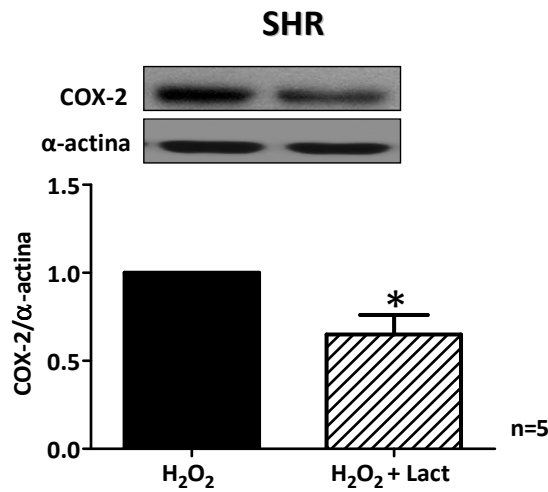


Fig. 51: Efecto del tratamiento previo con lactacistina (Lact, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de COX-2 inducida por H_2O_2 (50 μ M, 90 min) en cultivos de CMLV de aorta de ratas SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a H_2O_2 . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.6. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPAR α SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1 β

Una vez determinado el papel de las especies reactivas de oxígeno en la inducción de COX-2 por la citoquina proinflamatoria IL-1 β , nos propusimos analizar el efecto de los activadores PPAR, conocidos agentes con efecto antiinflamatorio, sobre dicho mecanismo. El tratamiento con el activador PPAR α fenofibrato (1-30 μ M, 18 h antes de IL-1 β), no modificó la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) ni en WKY ni en SHR (Fig. 52).

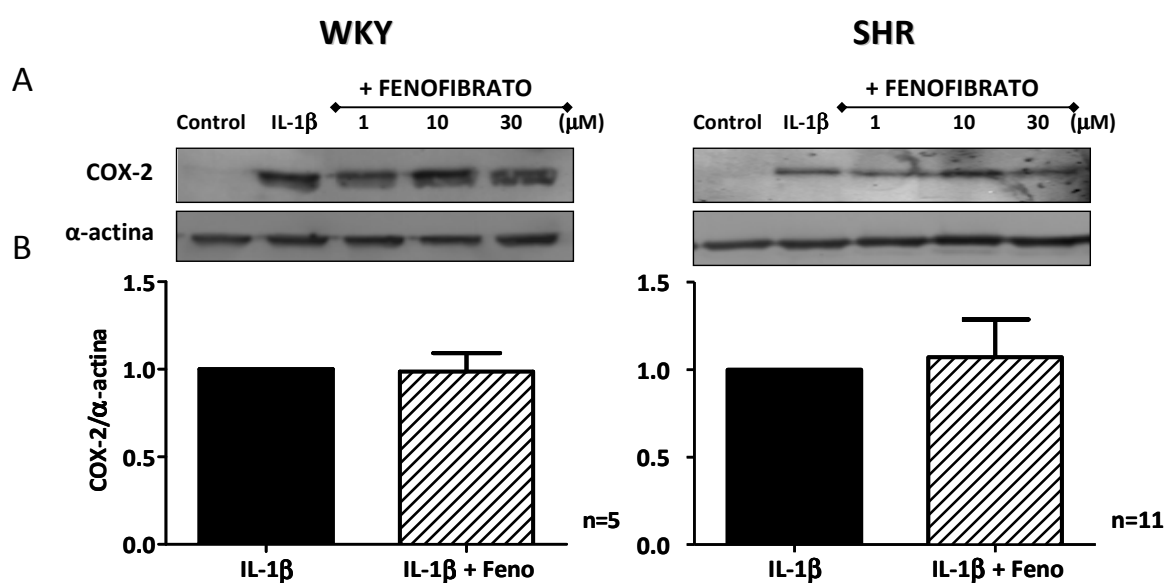


Fig. 52: A) Blots representativos del efecto de la incubación previa con el activador PPAR α fenofibrato (1-30 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR estimulados con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h). B) Efecto de 10 μ M de fenofibrato (Feno) sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . n indica el número de experimentos.

1.7. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPAR γ SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1 β

A continuación analizamos el efecto de diversos agonistas PPAR γ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β . Como se observa en la figura 53, la incubación previa durante 18 h con rosiglitazona (1-30 μ M), 15d-PGJ $_2$ (0,1-10 μ M) o pioglitazona (1-30 μ M), redujo la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β de forma concentración-dependiente.

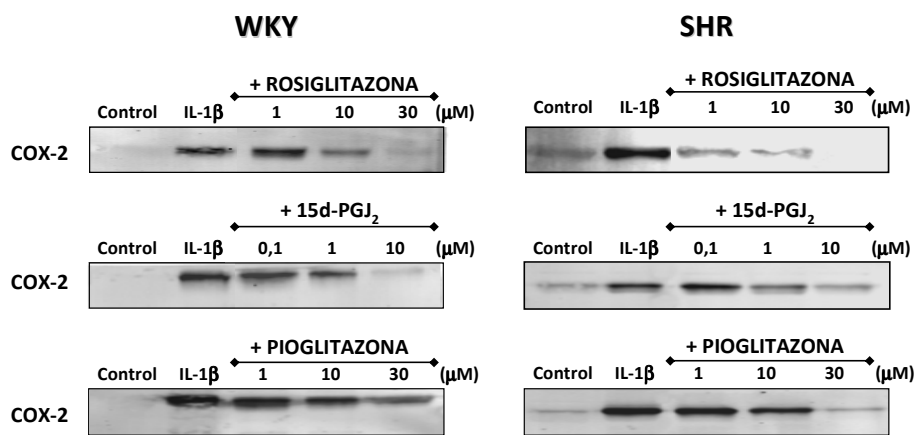


Fig. 53: Blots representativos de 3 experimentos del efecto de las distintas concentraciones de los activadores PPAR γ rosiglitazona, 15d-PGJ $_2$ y pioglitazona (18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR estimulados con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h).

En la figura 54 se muestra la cuantificación del efecto inhibitorio que tienen los tres activadores PPAR γ (a la concentración de 10 μ M) sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV tanto de WKY como de SHR.

Como se observa en la tabla 1, la reducción fue similar para los tres agonistas a la concentración de 10 μ M y similar en ambas cepas.

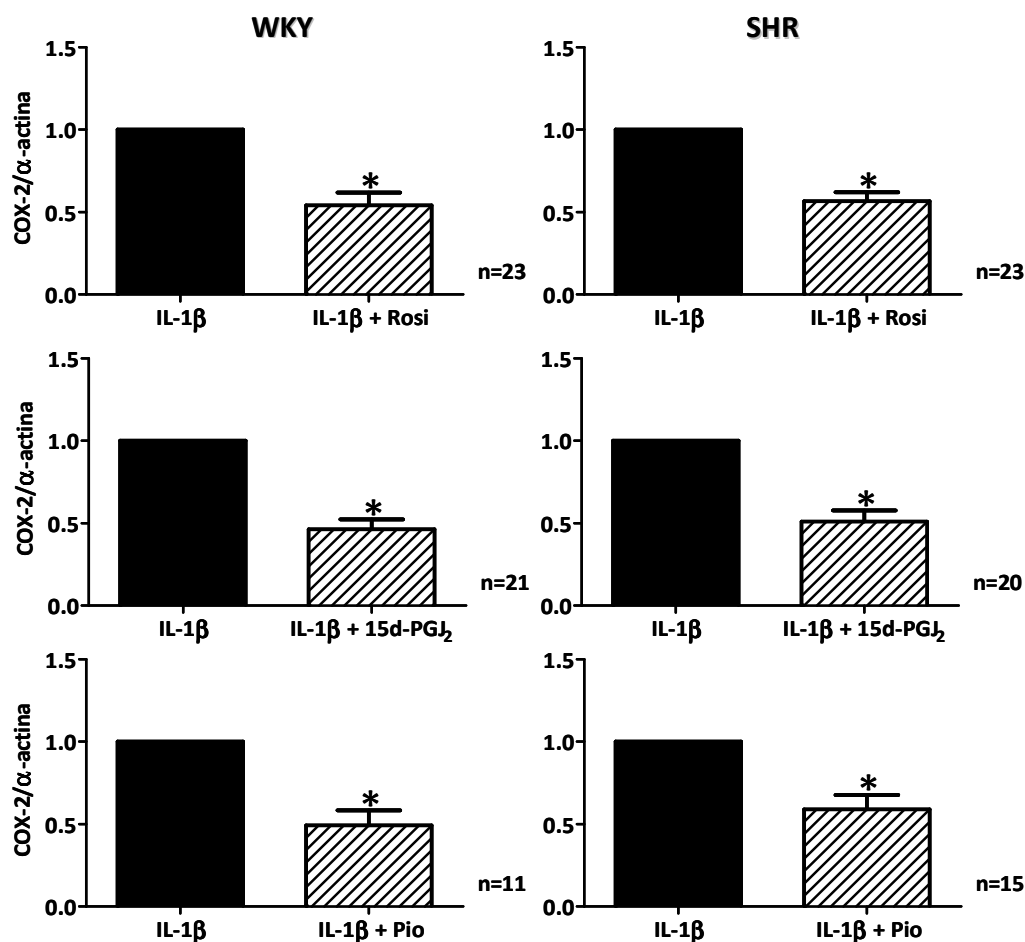


Fig. 54: Efecto de la incubación previa durante 18 h con los activadores PPAR γ rosiglitazona (Rosi), 15d-PGJ $_2$ y pioglitazona (Pio), todos ellos a una concentración de 10 μ M, sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

	ROSIGLITAZONA	15d-PGJ $_2$	PIOGLITAZONA
WKY	45,9 \pm 7,9 %	53,5 \pm 6,0 %	51,1 \pm 10,0 %
SHR	43,5 \pm 5,5 %	49,1 \pm 6,9 %	41,1 \pm 8,8 %

Tabla 1: Porcentaje de inhibición de la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) producido por los activadores PPAR γ rosiglitazona, 15d-PGJ $_2$ y pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) en CMLV de ratas WKY y SHR. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES.

1.7.1. Efecto del silenciamiento con siRNA de PPAR γ sobre la expresión de ARNm de PPAR γ inducida por IL-1 β

En nuestro laboratorio habíamos descrito que el activador de PPAR γ pioglitazona (10 μ M) incrementa la expresión del ARNm de PPAR γ inducida por IL-1 β en cultivos de CMLV de aorta de ratas SHR, indicando que la activación del receptor incrementaba su propia expresión (Pérez Girón, 2009). Ahora, además, observamos que el tratamiento con pioglitazona también incrementa los niveles de ARNm de PPAR γ inducidos por IL-1 β después del tratamiento con un siRNA específico para este receptor nuclear, tratamiento que produce una reducción en los niveles de expresión de PPAR γ en cultivos de CMLV de aorta de SHR (Fig. 55).

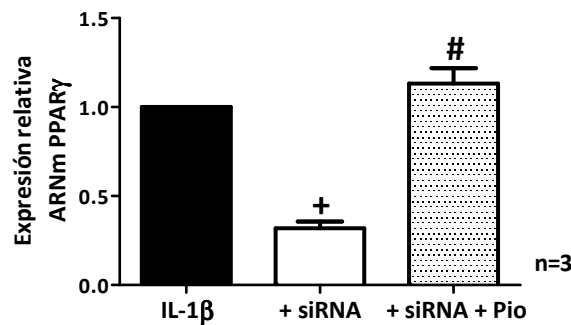


Fig. 55: Efecto del silenciamiento de PPAR γ por siRNA (5 nM) sobre la expresión relativa del ARNm de PPAR γ inducida con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en presencia y ausencia de pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β). La expresión se normalizó utilizando Ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . ⁺p<0,05 vs IL-1 β y [#]p<0,05 vs IL-1 β + siRNA, por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.7.2. Efecto del silenciamiento con siRNA de PPAR γ sobre la expresión de ARNm de COX-2 inducida por IL-1 β

Previos resultados de nuestro grupo mostraron que la utilización de un siRNA específico para PPAR γ incrementa la transcripción de COX-2 inducida por IL-1 β en CMLV de SHR, confirmando la regulación negativa que ejercen los niveles de expresión de PPAR γ sobre la transcripción de COX-2 en esta cepa (Pérez Girón, 2009). Ahora, además de confirmar este resultado (Fig. 56), observamos que en estas condiciones experimentales pioglitazona, que como acabamos de comentar aumenta PPAR γ , reduce la expresión de COX-2. Todos estos resultados sugieren que la activación de PPAR γ *downregula* la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β (Fig. 56).

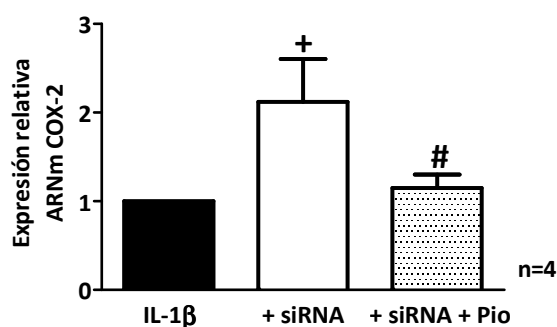


Fig. 56: Efecto del silenciamiento de PPAR γ por siRNA (5 nM) sobre la expresión relativa del ARNm de COX-2 inducida con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en presencia y ausencia de pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β). La expresión se normalizó utilizando Ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . ⁺p<0,05 vs IL-1 β y [#]p<0,05 vs IL-1 β + siRNA, por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.7.3. Efecto de los agonistas PPAR γ sobre la expresión de COX-2

A diferencia de lo que ocurría en células estimuladas, en ausencia de IL-1 β el tratamiento de las células de animales normotensos e hipertensos con los activadores PPAR γ rosiglitazona, 15d-PGJ $_2$ o pioglitazona (10 μ M, 18 h) aumentó la expresión de COX-2 (Fig. 57).

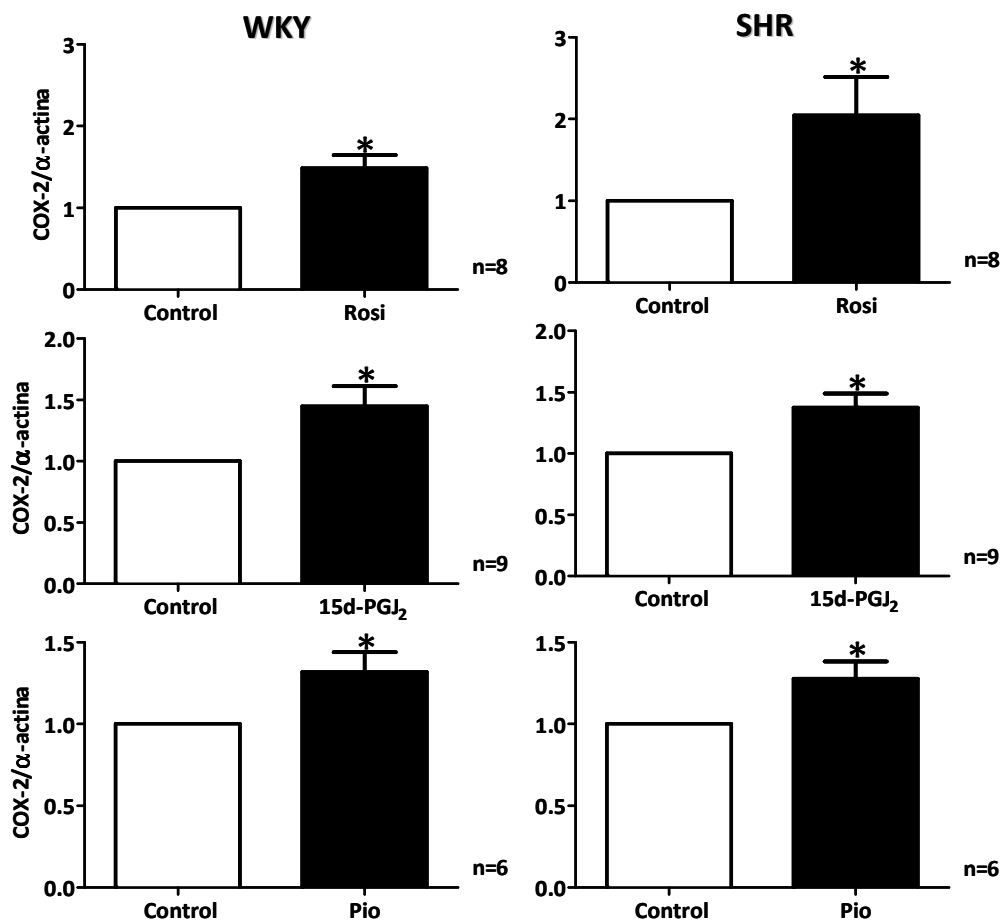


Fig. 57: Efecto de la incubación durante 18 h con los activadores PPAR γ rosiglitazona (Rosi), 15d-PGJ $_2$ y pioglitazona (Pio), todos ellos a una concentración de 10 μ M, sobre la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a su control. *p<0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.8. EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS INDUCIDA POR IL-1 β

1.8.1. Efecto de pioglitazona sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1 β

Una vez determinado el efecto de los agonistas PPAR γ sobre la expresión de COX-2 y puesto que las ROS contribuyen a la inducción de COX-2 inducida por la citoquina, analizamos el efecto de pioglitazona sobre la producción de ROS y sus efectos sobre la expresión de COX-2. El tratamiento de los cultivos celulares con pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) redujo los niveles proteicos de NOX-1, tanto en células procedentes de WKY como de SHR (Fig. 58). Esta reducción fue similar en ambas cepas (WKY: 25 \pm 7 %, n=6; SHR: 27 \pm 12 %, n=5; p>0,05).

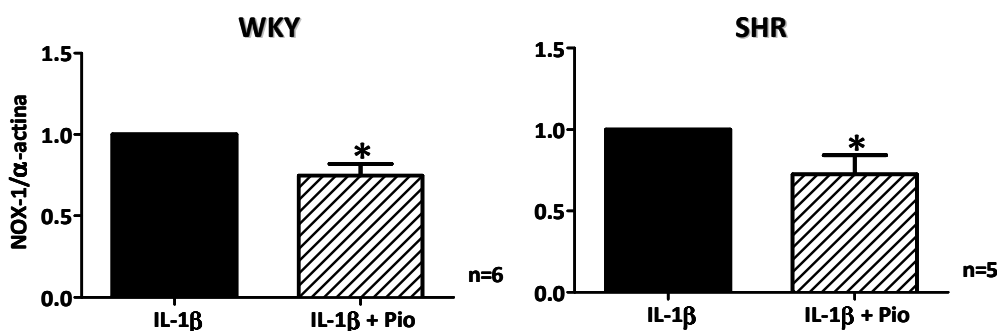


Fig. 58: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . *p<0,05 por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.8.2. Efecto de pioglitazona sobre la actividad NAD(P)H oxidasa inducida por IL-1 β

Una vez comprobados los efectos sobre la expresión de NOX-1, analizamos si la reducción en la expresión de la NAD(P)H oxidasa por pioglitazona regulaba su actividad. El tratamiento con pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) redujo la actividad de la NAD(P)H oxidasa en cultivos celulares de WKY y SHR estimulados con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h). Esta reducción fue similar en cultivos procedentes de ambas cepas (WKY: 19 \pm 4 %, n=16; SHR: 20 \pm 6 %, n=13; p>0,05) (Fig. 59). Estos datos sugieren que la activación de PPAR γ disminuye la producción de ROS por mecanismos dependientes de la regulación de la expresión de la NAD(P)H oxidasa, confirmando el efecto antioxidante de los agonistas de estos receptores nucleares.

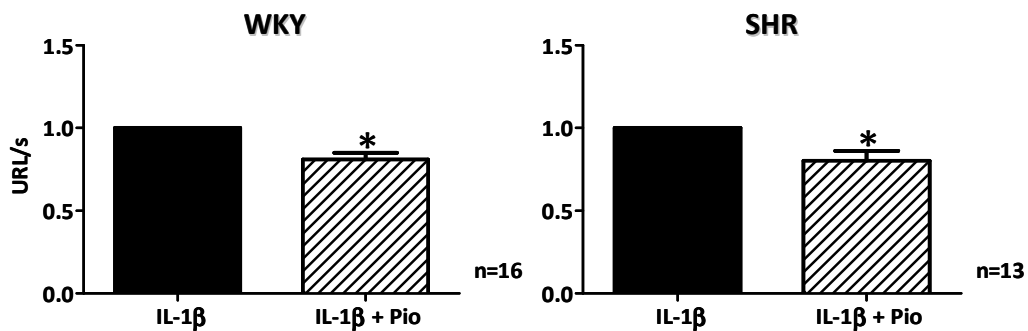


Fig. 59: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la actividad de la NAD(P)H oxidasa inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de luz por segundo (URL/s) respecto a IL-1 β . *p<0,05 por *t* de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.8.3. Efecto de pioglitazona sobre la producción de $O_2^{\cdot -}$ inducida por IL-1 β

Una vez comprobado que pioglitazona reduce la actividad de la NAD(P)H oxidasa, analizamos el efecto de este agonista sobre la producción de $O_2^{\cdot -}$. El tratamiento con el activador PPAR γ pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) redujo la producción de anión superóxido de forma similar en CMLV procedentes de ratas WKY y SHR estimuladas con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) (WKY: 48 ± 10 %, $n=3$; SHR: 52 ± 7 %, $n=5$; $p>0,05$) (Fig. 60).

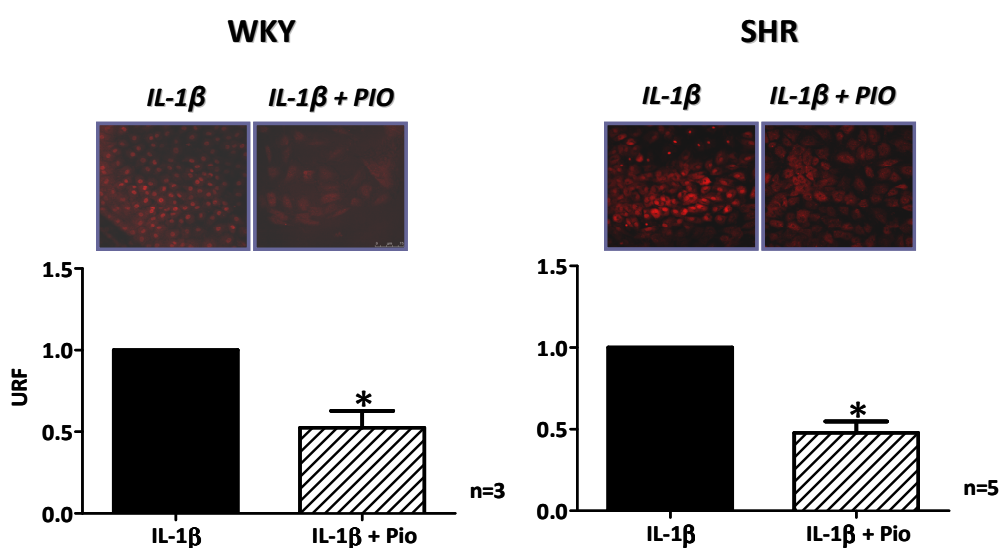


Fig. 60: Cuantificación de la fluorescencia emitida por dihidroetidio tras la estimulación con IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) de CMLV de ratas WKY y SHR tratadas con pioglitazona (Pio, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β). En la parte superior se muestran imágenes representativas. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal (objetivo 40X). Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF) respecto a la señal observada con IL-1 β . * $p<0,05$ por t de Student pareada. n indica el número de experimentos. Tamaño de la imagen 387,5 x 387,5 μ m.

1.8.4. Efecto de pioglitazona sobre la producción de H₂O₂ inducida por IL-1 β

El tratamiento con pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) también redujo el incremento en la producción de H₂O₂ inducido por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV procedentes de ratas SHR (Fig. 61). En cultivos celulares de WKY donde, como ya hemos comentado, la IL-1 β no modificó la producción de H₂O₂, pioglitazona no ejerció ningún efecto.

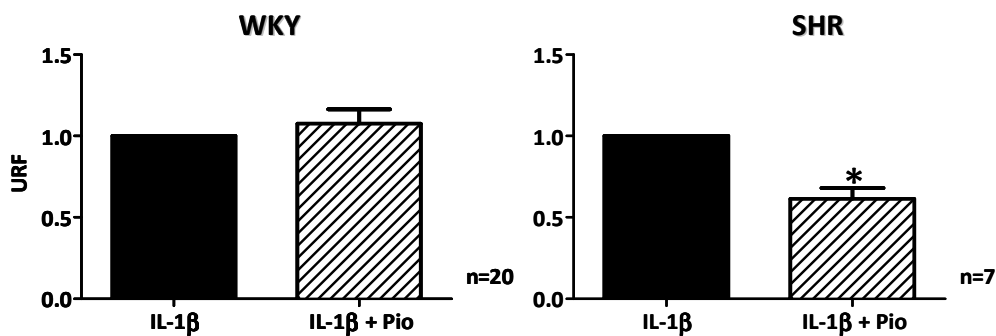


Fig. 61: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la producción de H₂O₂ inducida por IL-1 β (10 ng/ml, 24 h) en cultivos de CMLV procedentes de WKY y SHR, determinado por el método de la diclorofluoresceína. Los resultados (media \pm ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF) respecto a IL-1 β . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

Como ya hemos comentado, nuestros resultados sugieren que el aumento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1 β es dependiente, al menos en parte, del incremento en los niveles de O₂⁻ y/o H₂O₂. Por lo tanto, la reducción en la generación de estas especies reactivas de oxígeno por pioglitazona podría explicar la regulación negativa de la expresión de COX-2 ejercida por la activación de PPAR γ en CMLV tratadas con IL-1 β .

1.9. EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR H₂O₂

El tratamiento con los activadores PPAR γ rosiglitazona, 15d-PGJ₂ y pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de H₂O₂), redujo el incremento de la expresión de COX-2 inducida por H₂O₂ (50 μ M, 90 min) en cultivos de CMLV procedentes de SHR (Fig. 62). Por lo tanto, la activación de los receptores PPAR γ no sólo reduce la producción de ROS, sino que también reduce el efecto de las mismas sobre la expresión de COX-2.

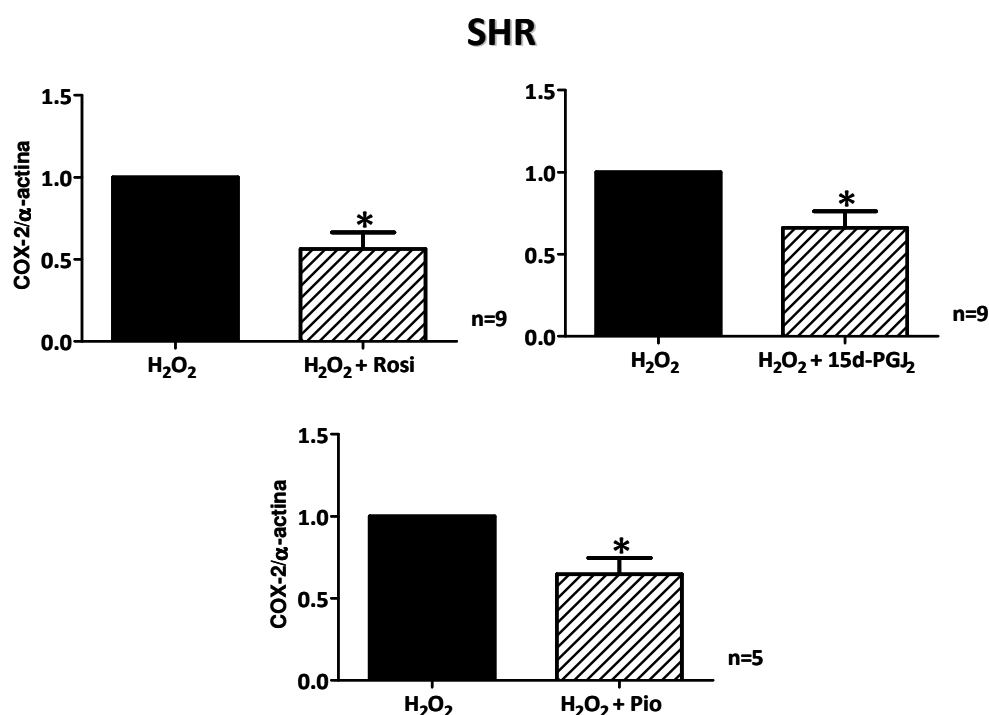


Fig. 62: Efecto de la incubación previa durante 18 h con los activadores PPAR γ rosiglitazona (Rosi), 15d-PGJ₂ y pioglitazona (Pio), todos ellos a una concentración de 10 μ M, sobre la expresión de COX-2 inducida por H₂O₂ (50 μ M, 90 min) en cultivos de CMLV procedentes de ratas SHR. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a H₂O₂. * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

1.10. EFECTO DE LOS AGONISTAS PPAR γ EN LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Habíamos mostrado previamente que IL-1 β incrementa la expresión nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B y la fosforilación de IKK en CMLV de SHR, mecanismo que contribuye al aumento en la expresión de COX-2. El tratamiento con pioglitazona (10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) inhibió tanto la expresión nuclear de p65 (Fig. 63) como la

fosforilación de IKK (Fig. 64), sugiriendo que el efecto de la pioglitazona sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β estaría mediada por la interferencia con la activación del factor de transcripción NF- κ B.

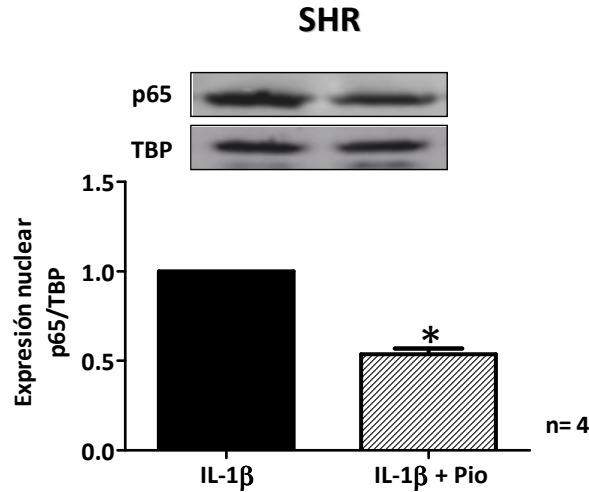


Fig. 63: Efecto del tratamiento previo con pioglitazona (Pio, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B en cultivos de CMLV de SHR estimulados durante 24 h con IL-1 β (10 ng/ml). La expresión se normalizó utilizando TBP. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

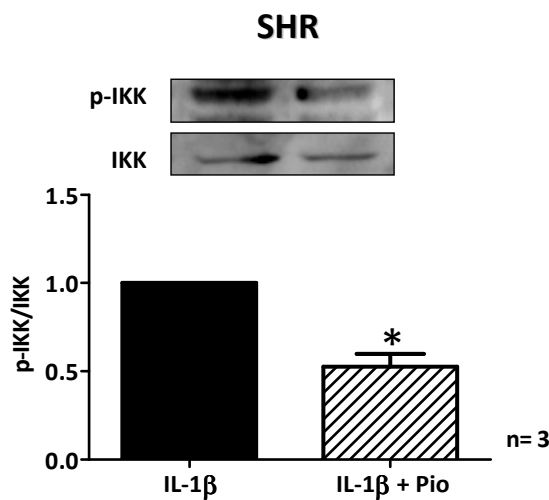


Fig. 64: Efecto del tratamiento previo con pioglitazona (Pio, 10 μ M, 18 h antes de IL-1 β) sobre la expresión de p-IKK en cultivos de CMLV de SHR estimulados durante 24 h con IL-1 β (10 ng/ml). La expresión se normalizó utilizando IKK. Los resultados se expresan como el valor medio \pm ES respecto a IL-1 β . * p <0,05 por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

2. TRATAMIENTO CRÓNICO DE RATAS SHR CON PIOGLITAZONA

Los resultados observados con los activadores PPAR γ en CMLV de WKY y SHR confirman que este receptor es importante en la reducción de la producción de ROS inducida por citoquinas y en la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2 y, por tanto, en la regulación de la respuesta inflamatoria vascular. Ya que la inflamación es una característica clave en el inicio, progreso e implicaciones clínicas de desórdenes cardiovasculares, incluyendo hipertensión esencial, nos propusimos analizar si el tratamiento crónico con pioglitazona de ratas adultas SHR altera la presión sanguínea así como la estructura y función vascular, y los mecanismos implicados en estos efectos.

2.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

Las ratas SHR de 6 meses de edad presentan mayores valores de presión arterial sistólica que las ratas WKY de la misma edad. El tratamiento de las ratas hipertensas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día) no modificó la presión arterial sistólica (Fig. 65).

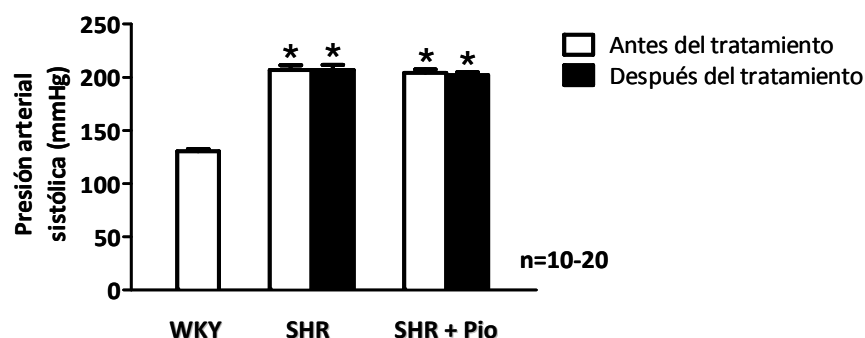


Fig. 65: Presión arterial sistólica en ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) sin tratamiento y tratadas durante 28 días con pioglitazona (Pio, 2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en mmHg. * $p < 0,05$ vs WKY control por t de Student no pareada. n indica el número de animales utilizados.

2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE EL REMODELADO Y RIGIDEZ VASCULAR DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA

2.2.1. Estructura

En condiciones pasivas (KH-0Ca^{2+}), los diámetros externo (Fig. 66A) e interno (Fig. 66B) aumentaron progresivamente al incrementar la presión intraluminal, tanto en animales normotensos como hipertensos. Sin embargo, como puede observarse en las figuras 66A y 66B, ambos valores fueron menores en todo el rango de presiones estudiado en arterias de ratas SHR comparadas con WKY. El tratamiento con pioglitazona no modificó ninguno de estos parámetros. Cuando medimos el diámetro interno en el miógrafo de alambres, también observamos que las AMR de SHR presentaban un diámetro interno reducido (WKY: $270,2 \pm 4,8 \mu\text{m}$, $n=8$; SHR: $241,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$, $n=8$; $p<0,05$) que no se modificaba tras el tratamiento con pioglitazona ($243,8 \pm 1,2 \mu\text{m}$, $n=8$; $p>0,05$). En cuanto a la relación media/luz, ésta fue menor en AMR de ratas WKY que en SHR (Fig. 66C); el tratamiento con pioglitazona no modificó dicha relación. Las proyecciones transversales de la pared vascular entera de arterias WKY y SHR, obtenidas por microscopia confocal, también mostraron un incremento en el grosor en vasos SHR que no se vio afectado tras el tratamiento con pioglitazona (Fig. 66D).

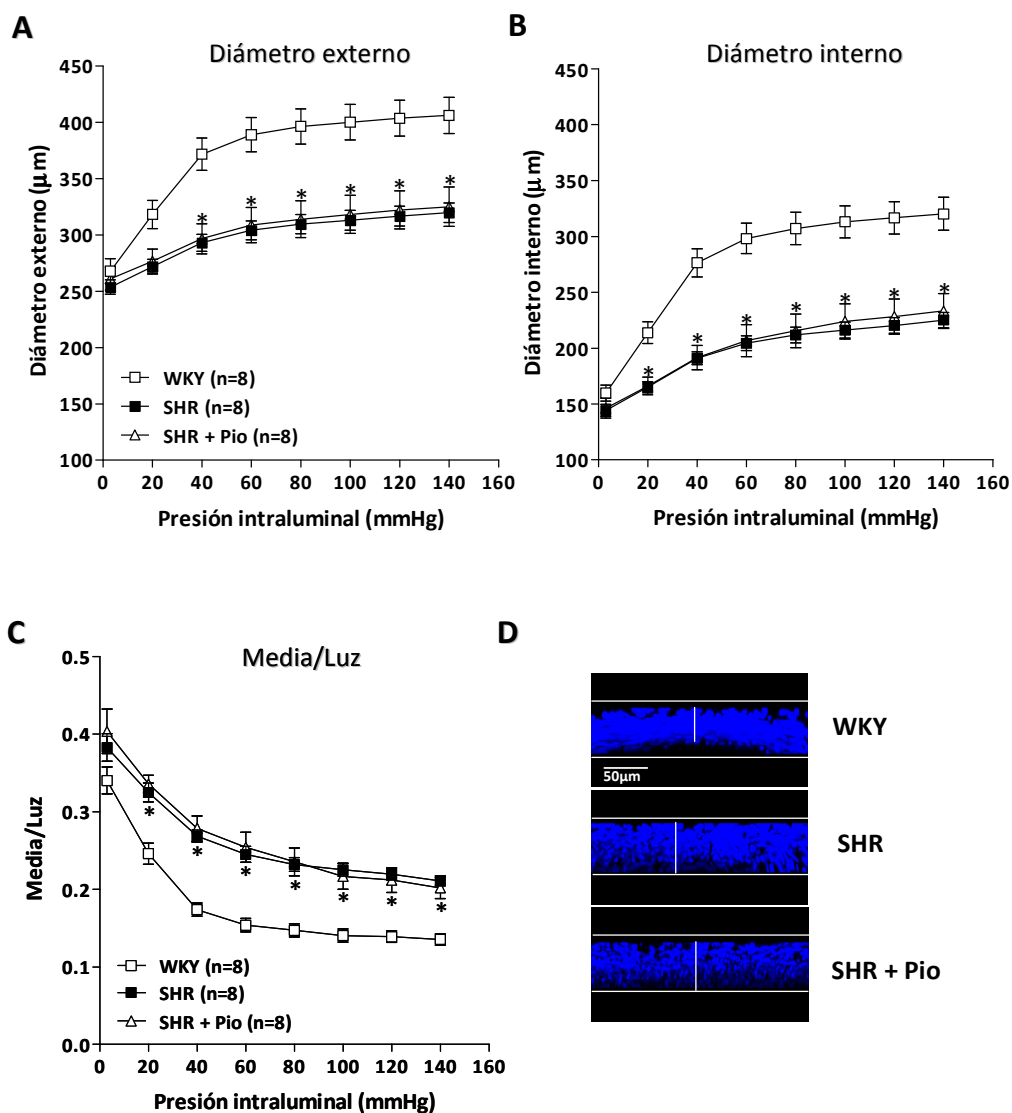


Fig. 66: Efecto del incremento en la presión intraluminal sobre (A) el diámetro externo, (B) el diámetro interno, y (C) la relación media/luz en AMR de ratas WKY y SHR tratadas o no con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). Los experimentos se realizaron en condiciones pasivas (KH-0Ca²⁺). Cada punto representa la media ± ES. *p<0,05 vs WKY, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales. (D) Reconstrucción tridimensional del grosor de la pared del vaso en AMR de ratas WKY y SHR tratadas o no con pioglitazona.

2.2.2. Mecánica

La figura 67 muestra los parámetros mecánicos de las AMR de ratas WKY y SHR tratadas o no con pioglitazona. Como se observa en la figura 67A, en arterias de SHR la curva estrés-tensión se encuentra desplazada hacia la izquierda respecto a la de las arterias de ratas WKY, lo que indica una mayor rigidez de la pared arterial de animales hipertensos, como se demuestra por el aumento del valor de β (WKY: $4,75 \pm 0,2$, $n=8$; SHR: $8,57 \pm 1,02$, $n=8$; $p<0,05$). El tratamiento con pioglitazona no modificó este parámetro ($8,36 \pm 0,71$, $n=9$; $p>0,05$ vs SHR) ni la curva estrés-tensión, por tanto, no afectó a la rigidez vascular.

A presiones intraluminales bajas, las AMR de WKY fueron más distensibles que las de ratas hipertensas. El tratamiento de las ratas hipertensas con pioglitazona no modificó la distensibilidad de las arterias (Fig. 67B).

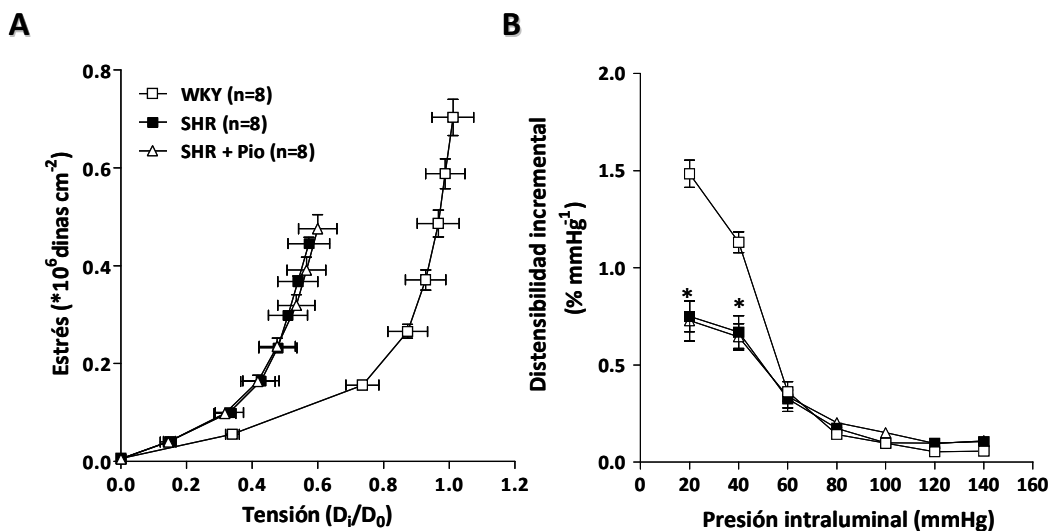


Fig. 67: Efecto de la presión intraluminal sobre (A) la relación estrés-tensión y (B) la distensibilidad incremental en AMR de ratas WKY y SHR tratadas o no con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). D_0 , diámetro interno a 3 mmHg; D_i , diámetro interno observado para una presión intravascular dada. Los experimentos se realizaron en condiciones pasivas ($KH-0Ca^{2+}$). Cada punto representa la media \pm ES. * $p<0,05$ vs WKY, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales.

2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LAS RESPUESTAS VASCULARES

Las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio inducidas por acetilcolina (10 μ M) fueron mayores en AMR de ratas normotensas ($91,4 \pm 0,9$ %, $n=15$) que de ratas hipertensas ($78,3 \pm 1,1$ %, $n=22$; $p<0,05$); el tratamiento con pioglitazona mejoró ligeramente esta respuesta, aunque fue aún menor que la observada en arterias de ratas normotensas ($83,1 \pm 1,9$ %, $n=19$; $p<0,05$ vs SHR y vs WKY). La contracción inducida por 120 mM K^+ -KHS fue igual en todos los grupos analizados (WKY: $3,3 \pm 0,2$ mN/mm, $n=15$; SHR: $3,2 \pm 0,1$ mN/mm, $n=22$; SHR + Pio: $3,11 \pm 0,09$ mN/mm, $n=19$; $p>0,05$). El agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina (0,1-30 μ M) dio lugar a respuestas vasoconstrictoras dependientes de concentración que fueron similares en segmentos de animales normotensos e hipertensos. El tratamiento de SHR con pioglitazona no modificó la respuesta contráctil a fenilefrina (Fig. 68).

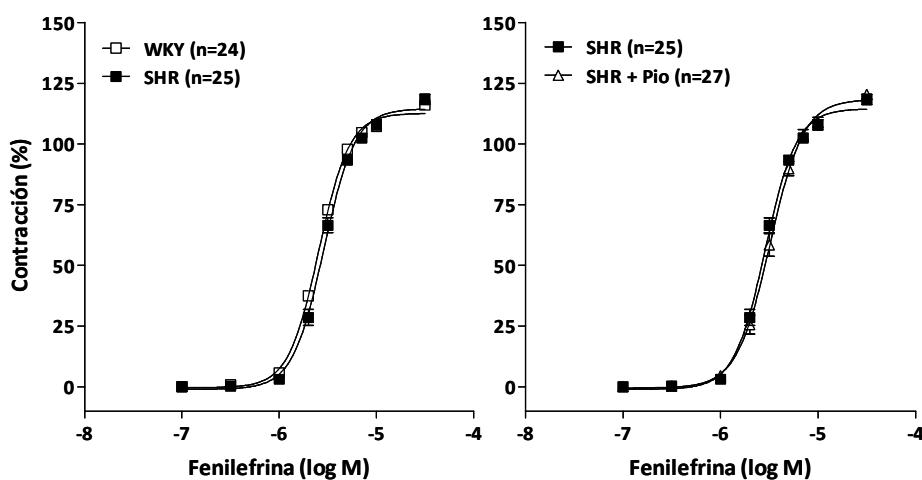


Fig. 68: Curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de WKY y SHR (izda) y SHR tratadas o no con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día) (dcha). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. n indica el número de animales.

2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE DERIVADOS DE COX-2 EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA

2.4.1. Expresión y localización vascular de COX-2

Nuestro grupo previamente había descrito que la expresión de la proteína COX-2 es mayor en arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR respecto a las de WKY (Briones y cols., 2002b). En este trabajo confirmamos este resultado y encontramos que, de forma similar, los niveles de ARNm de COX-2 fueron mayores en AMR de SHR que en WKY. El tratamiento con pioglitazona aumentó aún más los niveles del ARNm y la expresión proteica de COX-2 (Fig. 69).

Cuando analizamos por inmunofluorescencia la expresión de COX-2 en las distintas capas vasculares de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR tratadas con pioglitazona, se observó una expresión significativa de COX-2 en todas las capas del vaso, en células adventiciales, musculares y endoteliales (Fig. 69).

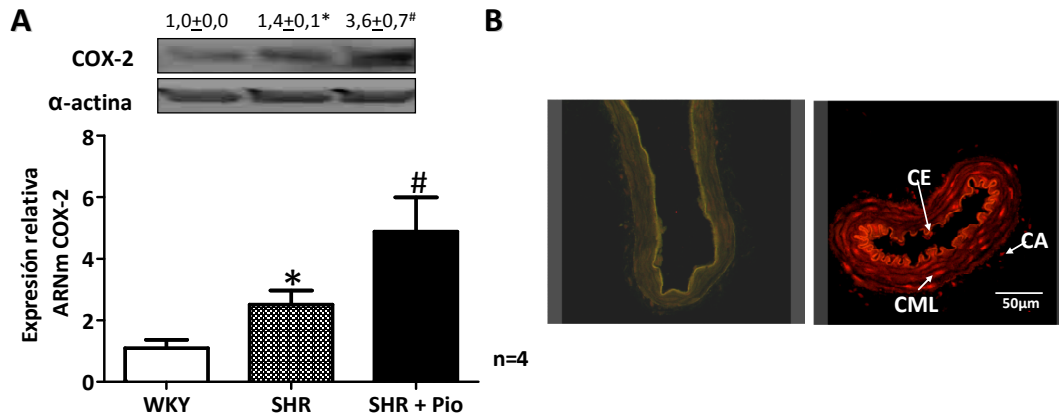


Fig. 69: A) En la parte superior se observa un blot representativo con el resultado del análisis densitométrico para la expresión de la proteína COX-2 y en la parte inferior RT-PCR cuantitativa para los niveles de ARNm de esta enzima en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR no tratadas y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La expresión se normalizó utilizando α -actina para la proteína y β_2 -microglobulina para el ARNm. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR no tratadas, por t de Student no pareada. n indica el número de animales. B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de COX-2 en secciones transversales de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día) y su control negativo (C-), $n=3$. CA: célula adventicial; CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa. Tamaño de la imagen 238 x 238 μm .

Una vez determinada la presencia de COX-2 en los distintos componentes celulares de la pared vascular, analizamos el efecto de la administración de pioglitazona (10 μ M, 42 h) sobre la expresión de COX-2 en CMLV y fibroblastos procedentes de aorta de ratas SHR. En CMLV se observó una expresión basal de COX-2 tanto a nivel de proteína como de ARNm, que aumentó ligera, pero significativamente, tras el tratamiento con pioglitazona (Fig. 70A). En fibroblastos adventiciales, la expresión proteica de COX-2 fue prácticamente indetectable. Tras el tratamiento con pioglitazona se observó expresión proteica de COX-2 así como un aumento en los niveles de ARNm (Fig. 70B).

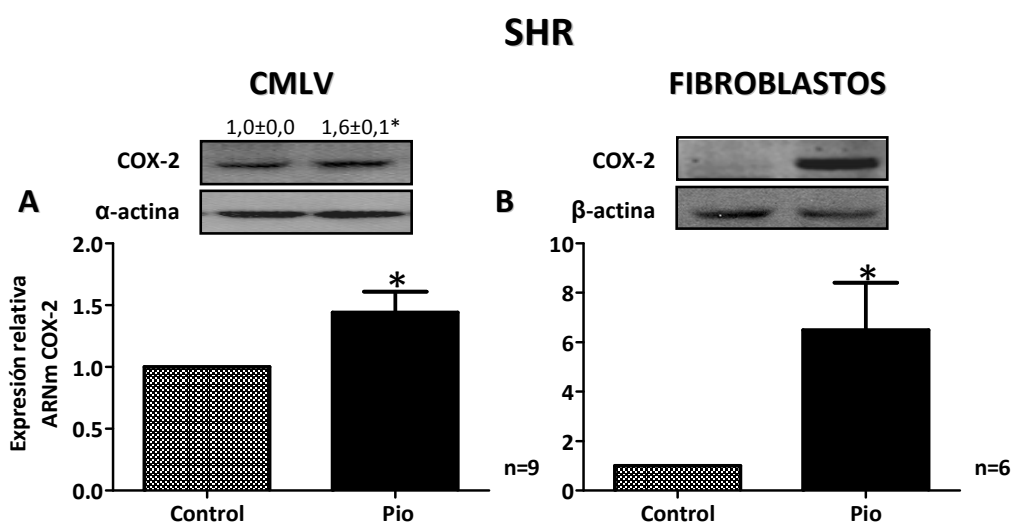


Fig. 70: En la parte superior se observa un blot representativo con el resultado del análisis densitométrico para la expresión de la proteína COX-2 y en la parte inferior RT-PCR cuantitativa para los niveles de ARNm de esta enzima en (A) células musculares lisas vasculares (CMLV) y (B) fibroblastos adventiciales de aorta de SHR en situación control y tras la incubación con pioglitazona (Pio, 10 μ M, 42 h). La expresión se normalizó utilizando α -actina en CMLV y β_2 -microglobulina para el ARNm. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de COX-2 en cultivos de SHR control. * $p < 0,05$ vs SHR control por t de Student pareada. n indica el número de experimentos.

2.4.2. Participación de COX-2 en la respuesta vascular a fenilefrina

Para comprobar si COX-2 participa en la contracción inducida por fenilefrina se utilizó el inhibidor selectivo de COX-2, NS 398 (1 μ M). Este fármaco no modificó la respuesta ni en segmentos de animales normotensos ni de hipertensos, pero disminuyó la respuesta a fenilefrina en arterias de SHR tratadas con pioglitazona (Fig. 71).

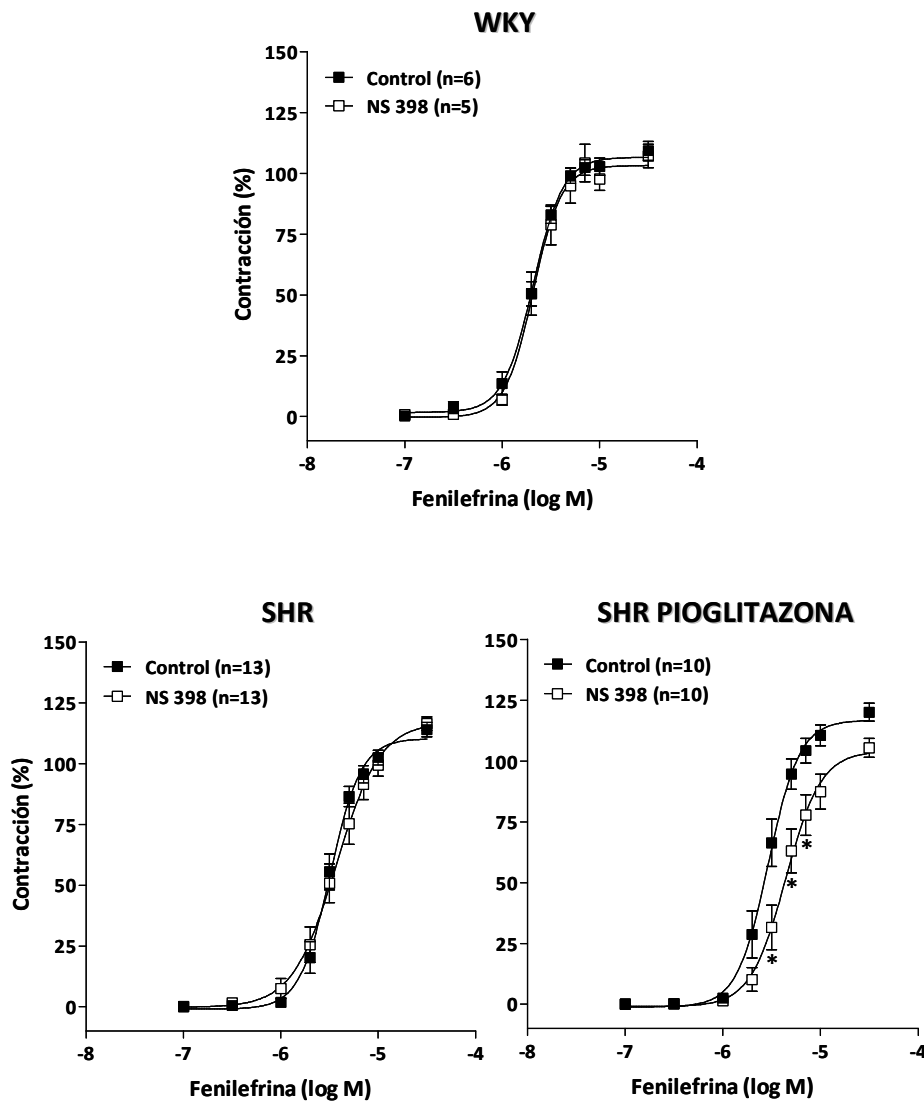


Fig. 71: Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con pioglitazona incrementa la participación de prostanoideos contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina.

2.4.3. Identificación de los prostanoideos implicados en el efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la respuesta vascular a fenilefrina

2.4.3.1. Participación de los receptores EP_1/EP_3

Un prostanoides capaz de generar respuestas vasoconstrictoras es la PGE_2 , la cual puede producir contracción a través de receptores EP_1 y EP_3 . Para determinar si la activación de estos receptores estaba implicada en la contracción inducida por fenilefrina, las arterias se incubaron con su antagonista SC 19220 (10 μ M). Este fármaco no modificó la respuesta contráctil inducida por fenilefrina ni en SHR control ni en SHR tratada con pioglitazona, excluyendo, por tanto, la participación de PGE_2 a través de sus receptores EP_1/EP_3 en el efecto vasoconstrictor de fenilefrina (Fig. 72).

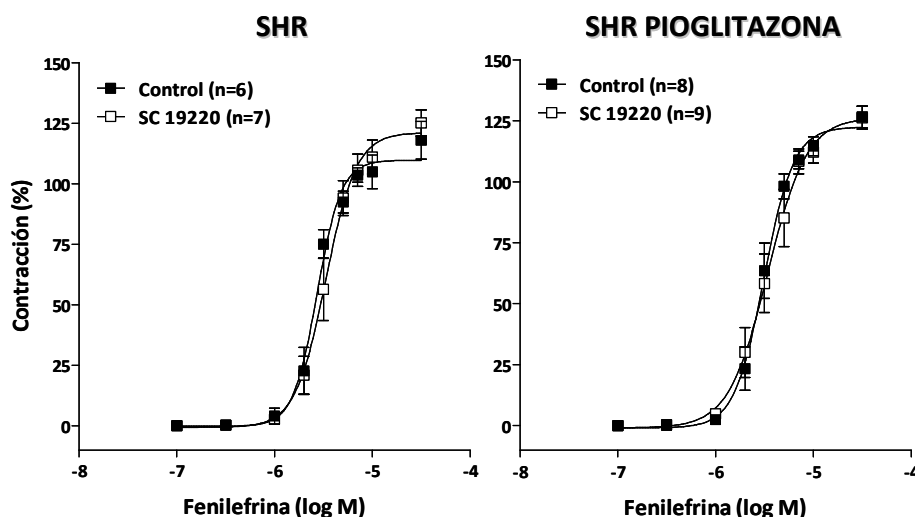


Fig. 72: Efecto de SC 19220 (10 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. n indica el número de animales.

2.4.3.2. Participación del receptor TP

Para estudiar si los prostanoideos contráctiles que participaban en la respuesta a fenilefrina lo hacían a través de la activación del receptor TP, se utilizó el antagonista de este receptor SQ 29,548 (1 μ M). Este fármaco no modificó la respuesta en SHR, mientras que redujo la contracción inducida por fenilefrina en arterias de SHR tratadas con pioglitazona (Fig. 73).

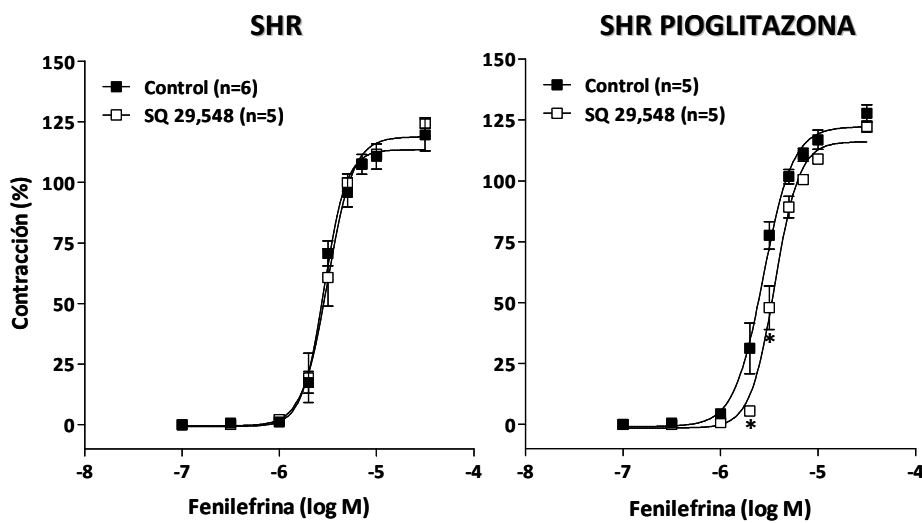


Fig. 73: Efecto de SQ 29,548 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales.

2.4.3.3. Participación de tromboxano

El TXA₂ es el principal prostanoide vasoconstrictor que actúa a través del receptor TP. Por ello, estudiamos el efecto del inhibidor de la tromboxano A₂ sintasa furegrelato (1 μM), sobre la respuesta contráctil inducida por fenilefrina. Este fármaco no modificó dicha respuesta ni en SHR control ni en SHR tratada con pioglitazona, lo que descarta la participación de TXA₂ (Fig. 74).

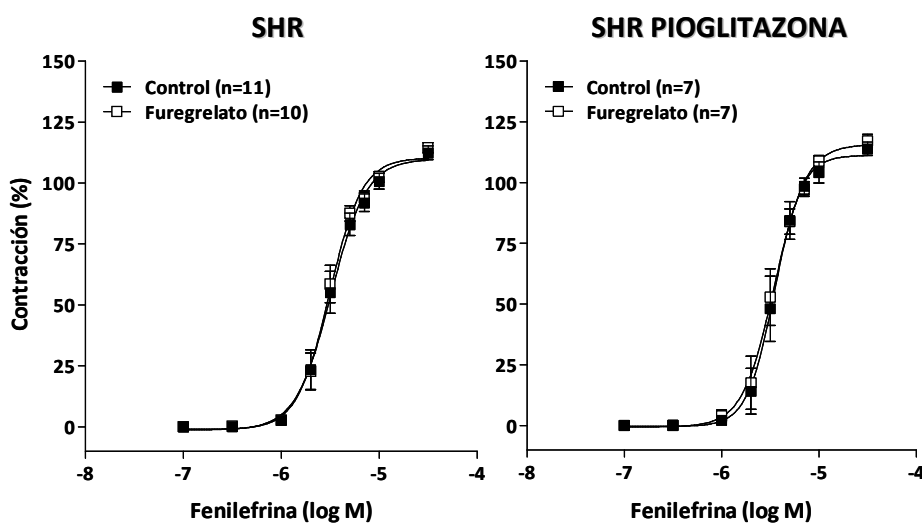


Fig. 74: Efecto de furegrelato (1 μM) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media ± ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS. n indica el número de animales.

2.4.3.4. Medida de los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano

Como hemos comentado anteriormente, los prostanoïdes contráctiles que participan en la respuesta a fenilefrina en arterias de animales tratados con pioglitazona actúan a través del receptor TP, aunque nuestros resultados descartan la implicación del TXA_2 . Sin embargo, otros derivados de la ciclooxigenasa pueden producir respuestas contráctiles por unión a este receptor. A continuación analizamos el efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la liberación de estos derivados de COX-2.

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ es uno de los prostanoïdes que puede inducir vasoconstricción mediada por el receptor TP. Este prostanoïde es rápidamente metabolizado a 13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$, siendo este metabolito el que se determina. De igual forma, los isoprostanos son una familia de eicosanoïdes que inducen también contracción a través del receptor TP. Puesto que no disponemos de herramientas farmacológicas, determinamos su producción. Los niveles de 13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano determinados en el medio Krebs-Henseleit, una vez finalizada la curva concentración-respuesta a fenilefrina, fueron similares en SHR y WKY. El tratamiento con pioglitazona no alteró la producción de 8-isoprostano ni de 13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Fig. 75).

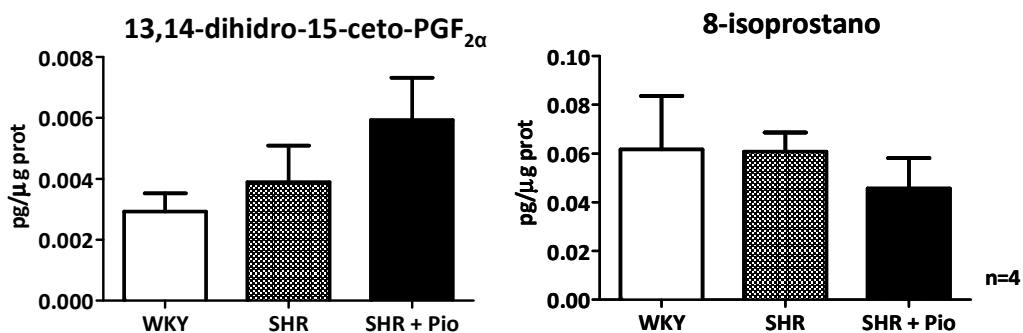


Fig. 75: Niveles de 13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano tras la realización de la curva concentración-respuesta a fenilefrina en el medio de incubación en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). Los resultados se expresan como media \pm ES. n indica el número de animales.

2.4.3.5. Participación de prostaciclina

La prostaciclina es el principal prostanoide vasodilatador producido por el endotelio. Sin embargo, también se ha demostrado que a elevadas concentraciones o en determinadas situaciones como envejecimiento e hipertensión, la prostaciclina puede inducir vasoconstricción a través de la unión con el receptor TP (Rapoport y Williams, 1996; Blanco-Rivero y cols., 2005). Para estudiar el papel de este prostanoide en la respuesta a fenilefrina, se analizó el efecto de un inhibidor de la PGI₂ sintasa, tranilcipromina (10 μ M). Este fármaco no modificó la respuesta en segmentos de SHR pero redujo la contracción inducida por fenilefrina tras el tratamiento con pioglitazona (Fig. 76), sugiriendo la participación de PGI₂, como agente vasoconstrictor, en dicha respuesta.

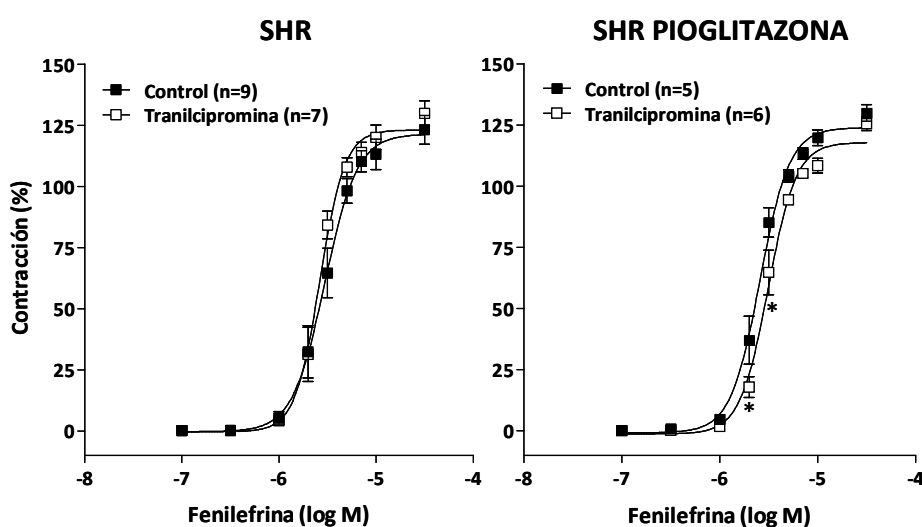


Fig. 76: Efecto de tranilcipromina (10 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K⁺-KHS. *p<0,05 vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales.

En ratas tratadas con pioglitazona el antagonista del receptor IP RO 1138452 (1 μ M) no modificó las contracciones inducidas por fenilefrina (Fig. 77A), lo que descarta la participación de la activación de este receptor por prostacilina en la respuesta a fenilefrina.

La combinación de RO 1138452 (1 μ M) con SQ 29,548 (1 μ M) redujo la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina (Fig. 77B). El efecto fue similar al observado cuando se utilizó SQ 29,548 solo, como se muestra por la comparación de la diferencia del área bajo la curva a fenilefrina (dABC) (SQ 29,548: $19,5 \pm 3,1$ n=5; SQ 29,548 + RO 1138452: $23,5 \pm 5,8$ n=7; p=0,05).

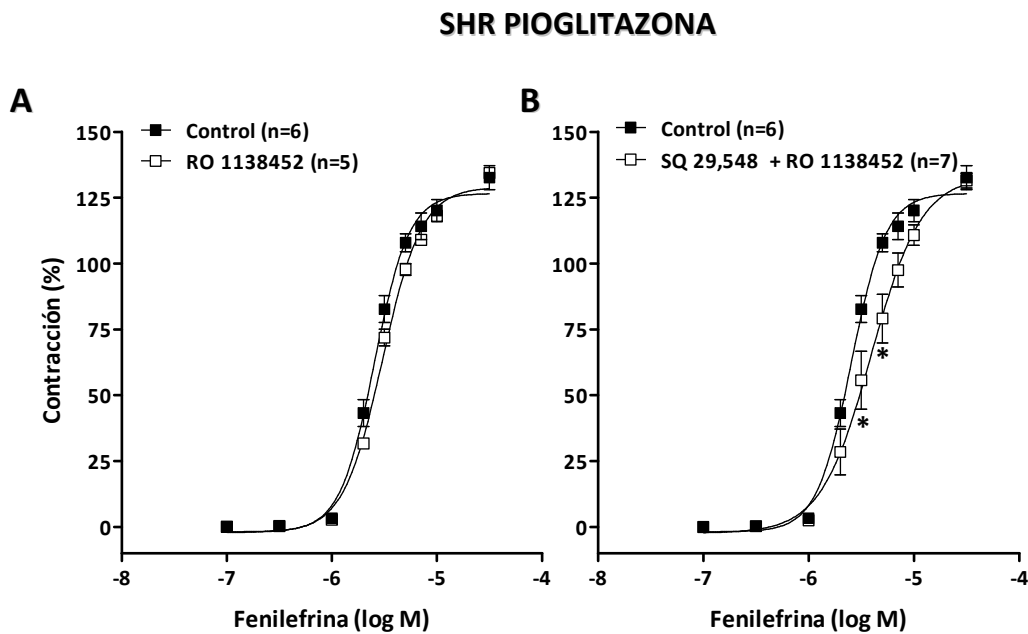


Fig. 77: A) Efecto de RO 1138452 (1 μ M) y B) de la combinación de RO 1138452 (1 μ M) y SQ 29,548 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. *p<0,05 vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales.

Una vez determinado que en nuestras condiciones experimentales prostaciclina parece producir vasoconstricción a través del receptor TP, comprobamos el efecto de la administración de su análogo iloprost. En segmentos precontraídos con fenilefrina, a una concentración que produce aproximadamente un 50% de la contracción inducida por K^+ -KHS, iloprost ($1 \mu\text{M}$) indujo una respuesta bifásica que consistía en una contracción rápida seguida de una relajación lenta (Fig. 78A). La fase contráctil fue mayor en arterias de SHR que en WKY y no se alteraba después del tratamiento con pioglitazona (Fig. 78B). En AMR de ratas tratadas con pioglitazona esta respuesta contráctil provocada por iloprost no fue modificada ni por RO 1138452 ni por SC 19220, pero fue reducida por SQ 29,548 (Fig. 78C).

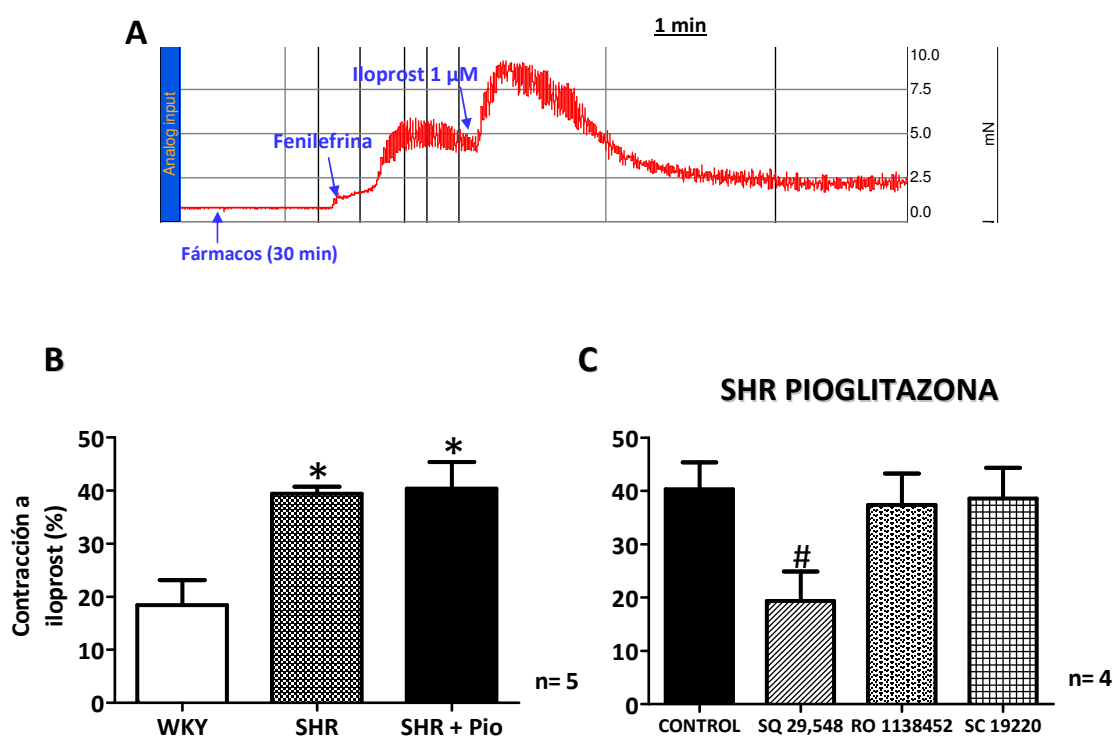


Fig. 78: A) Experimento representativo del efecto de la adición de iloprost a arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR tratadas con pioglitazona precontraídas con fenilefrina. B) Fase contráctil de la respuesta inducida por iloprost en AMR de ratas WKY y SHR tratadas o no con pioglitazona durante 28 días (Pio, $2,5 \text{ mg/Kg} \times \text{día}$). C) Efecto de SQ 29,548 ($1 \mu\text{M}$), RO 1138452 ($1 \mu\text{M}$) y SC 19220 ($10 \mu\text{M}$) sobre la contracción inducida por iloprost en ratas tratadas con pioglitazona. Los resultados (media \pm ES) están expresados como porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs pioglitazona control por *t* de Student no pareada. n indica el número de animales.

La fase vasodilatadora a iloprost era más lenta en arterias de SHR que en WKY, como puede observarse en la curva tiempo-respuesta (Fig. 79A). Tras el tratamiento con pioglitazona la respuesta era similar a la inducida en las ratas no tratadas (Fig. 79A). En AMR de ratas tratadas con pioglitazona la relajación inducida por iloprost era casi abolida por RO 1138452, acelerada cuando se preincubaba con SQ 29,548, mientras que no fue afectada por SC 19220 (Fig. 79B).

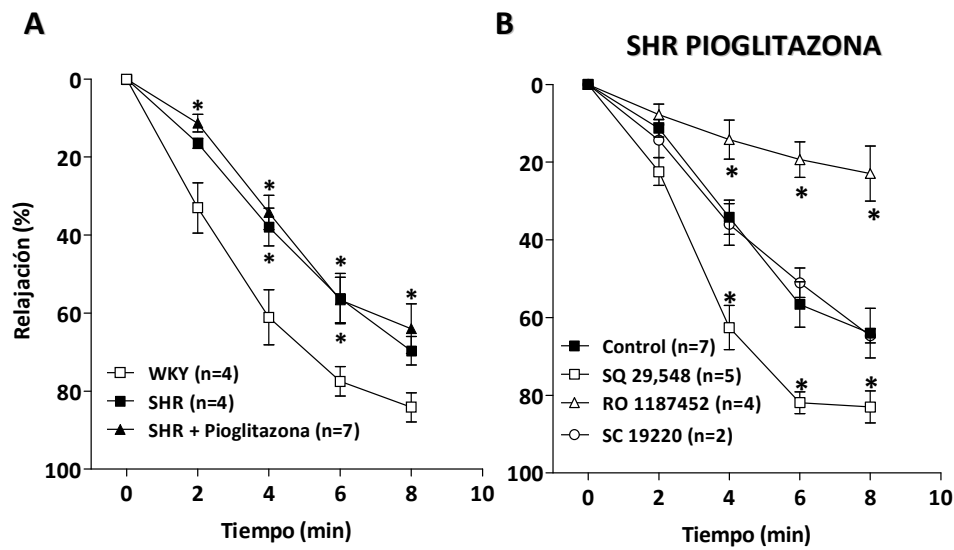


Fig. 79: A) Relajación en función del tiempo inducida por iloprost en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR tratadas o no con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). B) Efecto de SQ 29,548 (1 μ M), RO 1138452 (1 μ M) y SC 19220 (10 μ M) sobre la relajación inducida por iloprost en ratas tratadas con pioglitazona. Los resultados (media \pm ES) están expresados como porcentaje de la contracción previa. * $p < 0,05$ vs WKY (A) o vs pioglitazona control (B) por *t* de Student no pareada. n indica el número de animales.

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que en ratas tratadas con pioglitazona la PGI_2 participa como vasoconstrictor a través de receptores TP en la respuesta a fenilefrina. Por esto, se determinó la producción de su metabolito, 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$, en la solución de Krebs-Henseleit una vez finalizada la curva concentración-respuesta a fenilefrina. Los niveles de este metabolito fueron menores en arterias mesentéricas de resistencia de SHR comparadas con las de su control normotenso WKY. El tratamiento de las ratas SHR con pioglitazona produjo un aumento significativo de la producción de este prostanoides (Fig. 80).

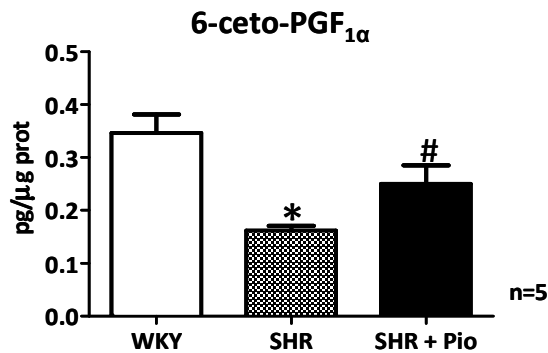


Fig. 80: Niveles de 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$ tras la realización de la curva concentración-respuesta a fenilefrina en el medio de incubación en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). Los resultados se expresan como media \pm ES. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR, por *t* de Student no pareada. n indica el número de animales.

2.4.3.6. Papel del endotelio

Tras la eliminación del endotelio, la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de ratas tratadas con pioglitazona fue desplazada hacia la izquierda (E_{max} : $115,2 \pm 2,1$ % vs $130,9 \pm 2,6$ % para E+, n=38, y E-, n=8, respectivamente, $p < 0,05$; pD_2 : $5,51 \pm 0,02$ vs $5,74 \pm 0,03$ para E+ y E-, respectivamente, $p < 0,05$), y este desplazamiento fue similar al observado en segmentos de SHR sin tratar (datos no mostrados).

Para analizar si los prostanoideos derivados de COX-2 que estaban participando en la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en ratas SHR tratadas con pioglitazona eran de origen endotelial, se estudió el efecto de NS 398 en segmentos a los que se había eliminado mecánicamente esta capa vascular. Como podemos observar en la figura 81A, NS 398 ($1 \mu M$) disminuyó la contracción inducida por fenilefrina en segmentos sin endotelio (E-); sin embargo, este efecto inhibitorio fue mucho menor que el observado en segmentos con el endotelio intacto, como muestran los valores del análisis de la diferencia del área bajo la curva concentración-respuesta (Fig. 81B), lo que sugiere una importante participación del endotelio en la producción de derivados de COX-2.

En segmentos de ratas SHR tratadas con pioglitazona, la eliminación del endotelio abolió por completo el efecto inhibitorio inducido por SQ 29,548 sobre la contracción inducida por fenilefrina (Fig. 82).

Todos estos resultados sugieren que el tratamiento con pioglitazona aumenta la participación de prostanoideos contráctiles derivados del endotelio en la respuesta a fenilefrina que actúan a través de la unión al receptor TP. Entre los prostanoideos implicados en ese aumento de la respuesta contráctil se encuentra la PGI_2 .

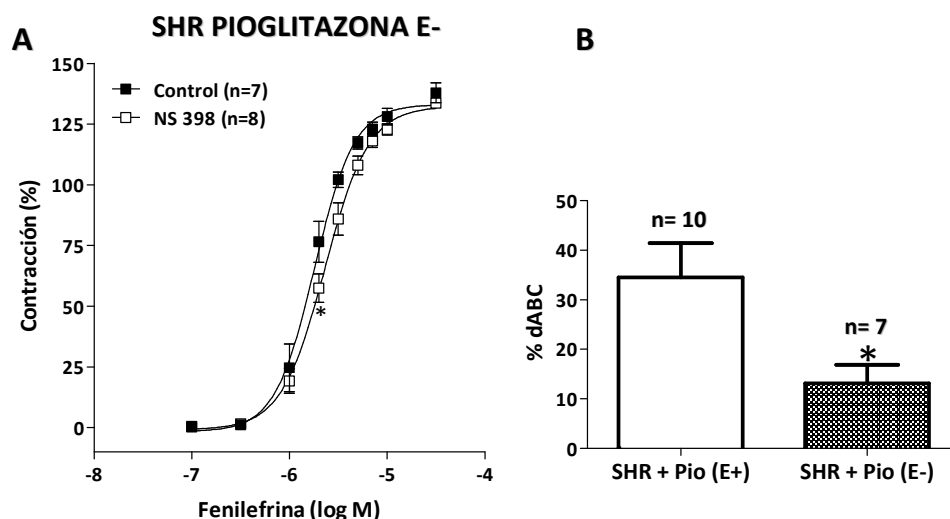


Fig. 81: A) Efecto de NS 398 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos sin endotelio (E-) de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. B) Diferencias del área bajo la curva a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de NS 398 en segmentos con (E+) o sin endotelio (E-) de ratas tratadas. Los resultados (media \pm ES) están expresados como porcentaje del ABC en situación control. * $p < 0,05$ vs SHR + Pio (E+) por t de Student no pareada. n indica el número de animales.

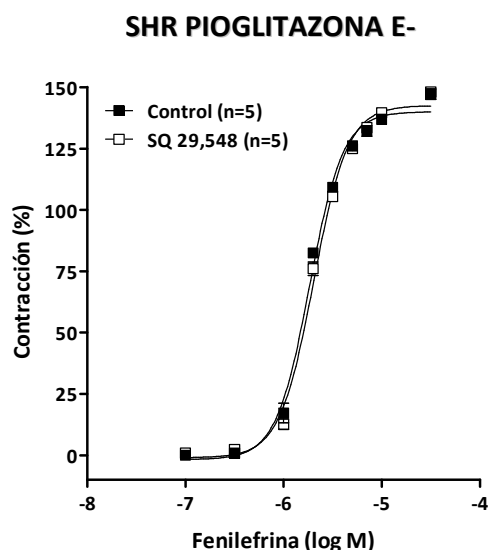


Fig. 82: Efecto de SQ 29,548 (1 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos sin endotelio (E-) de arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a K^+ -KHS. n indica el número de animales.

2.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA

En hipertensión se ha descrito ampliamente una incrementada producción de $O_2^{\cdot-}$ (Alvarez y cols., 2007; García-Redondo y cols., 2009b). Además, ese $O_2^{\cdot-}$ es capaz de modular las respuestas contráctiles, incluyendo la producida por los agonistas α -adrenérgicos (Briones y cols., 2002b; Alvarez y cols., 2008; Wiggers y cols., 2008). Existen distintas fuentes a partir de las cuales se pueden generar especies reactivas de oxígeno a nivel vascular, entre ellas la NAD(P)H oxidasa y la xantina oxidasa. Para estudiar la participación de ROS procedentes de estas fuentes en la contracción a fenilefrina, preincubamos las arterias con alopurinol, inhibidor de la xantina oxidasa, y con apocinina, inhibidor de la NAD(P)H oxidasa. Alopurinol (0,3 mM) desplazó a la derecha la curva concentración-respuesta a fenilefrina en SHR, pero no en WKY. El tratamiento con pioglitazona abolió el efecto del alopurinol sobre la contracción inducida por fenilefrina (Fig. 83).

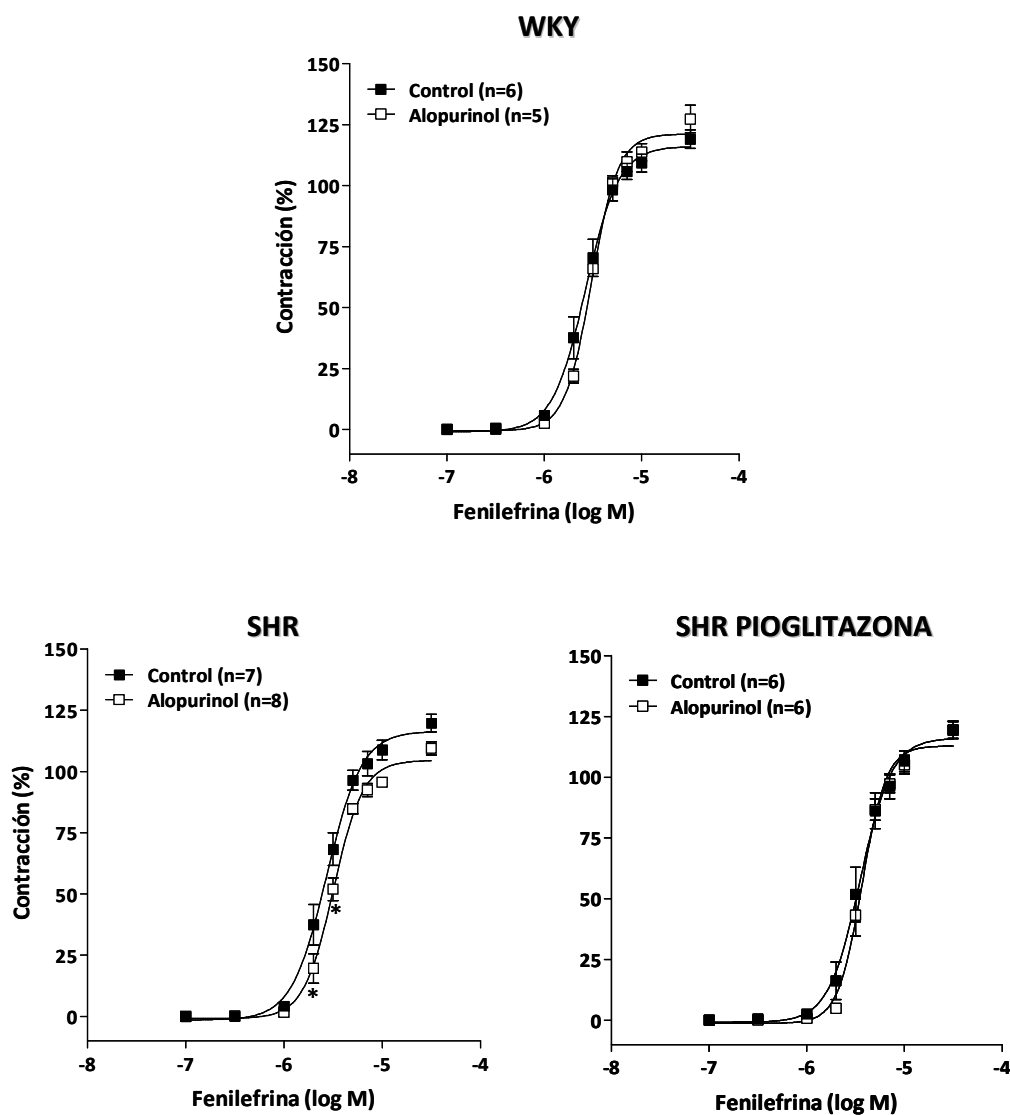


Fig. 83: Efecto de alogpurinol (0,3 mM) sobre la curva concentración-respuesta inducida por fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar o tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. n indica el número de animales.

Apocinina (0,3 mM) inhibió la respuesta contráctil a fenilefrina en WKY y SHR, aunque el efecto inhibitorio fue mayor en arterias de ratas hipertensas, como se muestra en el análisis de la diferencia del área bajo la curva concentración-respuesta. El tratamiento con pioglitazona abolió el efecto inhibitorio de apocinina sobre la contracción inducida por fenilefrina (Fig. 84).

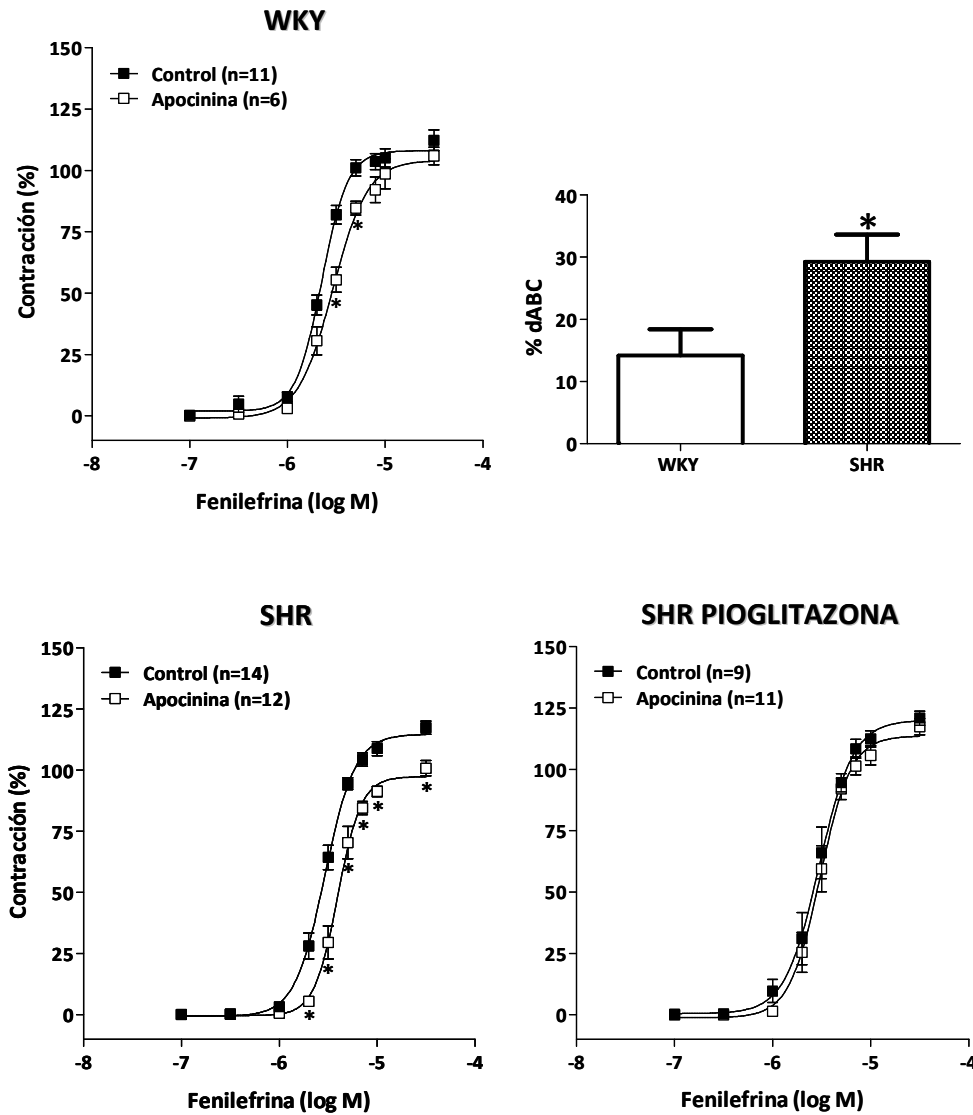


Fig. 84: Efecto de apocinina (0,3 mM) sobre la curva concentración-respuesta inducida por fenilefrina en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar o tratadas con pioglitazona durante 28 días (2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo la curva a fenilefrina (dABC) en arterias de ratas WKY y SHR no tratadas en ausencia y presencia de apocinina, representadas como porcentaje del ABC en situación control en cada caso. * $p < 0,05$ vs WKY por t de Student no pareada. n indica el número de animales.

2.5.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión vascular de NOX-1

Una vez comprobado que el tratamiento con pioglitazona reducía la participación de ROS, analizamos la expresión de NOX-1, subunidad catalítica de la NAD(P)H oxidasa y principal implicada en la respuesta inflamatoria. Los niveles de ARNm de NOX-1 fueron mayores en arterias de ratas SHR que en arterias de WKY. El tratamiento de SHR con pioglitazona normalizó dichos niveles, aboliendo las diferencias entre cepas (Fig. 85).

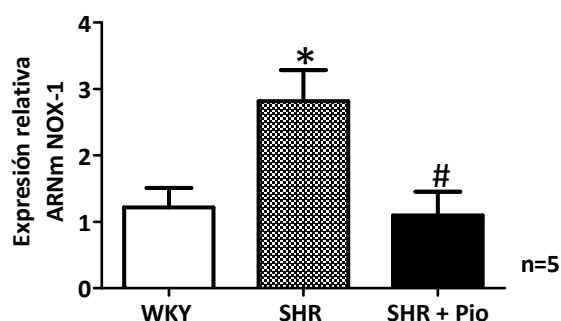


Fig. 85: Expresión del ARNm de NOX-1 por RT-PCR cuantitativa en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La expresión se normalizó utilizando β_2 -microglobulina. Los resultados (media \pm ES) están expresados como la expresión relativa de ARNm con respecto al control normotenso WKY. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR, por *t* de Student no pareada. n indica el número de animales.

2.5.2. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ y de malondialdehído

Nuestro grupo ha descrito previamente que la producción de $O_2^{\cdot-}$ es mayor en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de animales hipertensos que en segmentos de animales normotensos (García-Redondo y cols., 2009b); estos resultados fueron confirmados en el presente trabajo (Fig. 86). Además, observamos que el tratamiento de SHR con pioglitazona redujo la producción de $O_2^{\cdot-}$ en arterias mesentéricas de resistencia (Fig. 86).

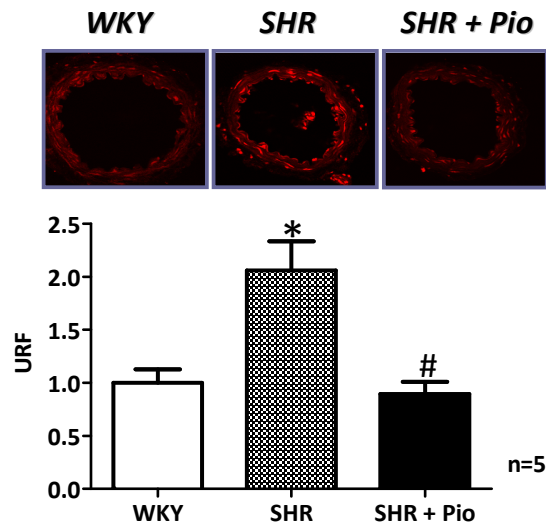


Fig. 86: Cuantificación de la fluorescencia emitida por dihidroetidio en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). En la parte superior se muestran imágenes representativas. Los resultados (media \pm ES) están expresados en relación a la señal observada en WKY. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR, por *t* de Student no pareada. *n* indica el número de animales. Tamaño de la imagen 238 x 238 μ m.

Nuestro grupo también ha descrito mayores niveles de MDA en el plasma de ratas hipertensas que en sus controles normotensos (Alvarez y cols., 2007). En este trabajo observamos asimismo esta diferencia, y que el tratamiento con pioglitazona no modifica los niveles plasmáticos de MDA (Fig. 87).

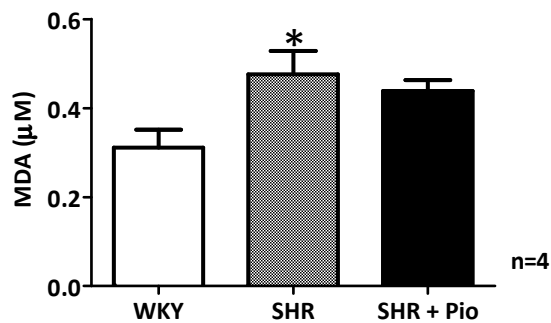


Fig. 87: Medida de los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) en ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). Los resultados se expresan como media \pm ES. * $p < 0,05$ vs WKY por *t* de Student no pareada. *n* indica el número de animales.

2.5.3. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión vascular de SOD y catalasa

Como ya hemos comentado existen tres isoformas de SODs que presentan distinta localización celular. Todas las SODs catalizan la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y oxígeno molecular. La cobre/zinc-SOD (Cu/Zn-SOD) se encuentra en el citosol, núcleo y peroxisomas, la manganeso-SOD (Mn-SOD) se encuentra en la mitocondria y la extracelular-SOD (EC-SOD) se secreta al espacio extracelular. El análisis por Western Blot reveló una menor expresión de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y EC-SOD en arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR que en arterias de ratas WKY (Fig. 88). El tratamiento de ratas SHR con pioglitazona no modificó la expresión de Cu/Zn-SOD ni de Mn-SOD, aunque redujo aún más la expresión de EC-SOD (Fig. 88).

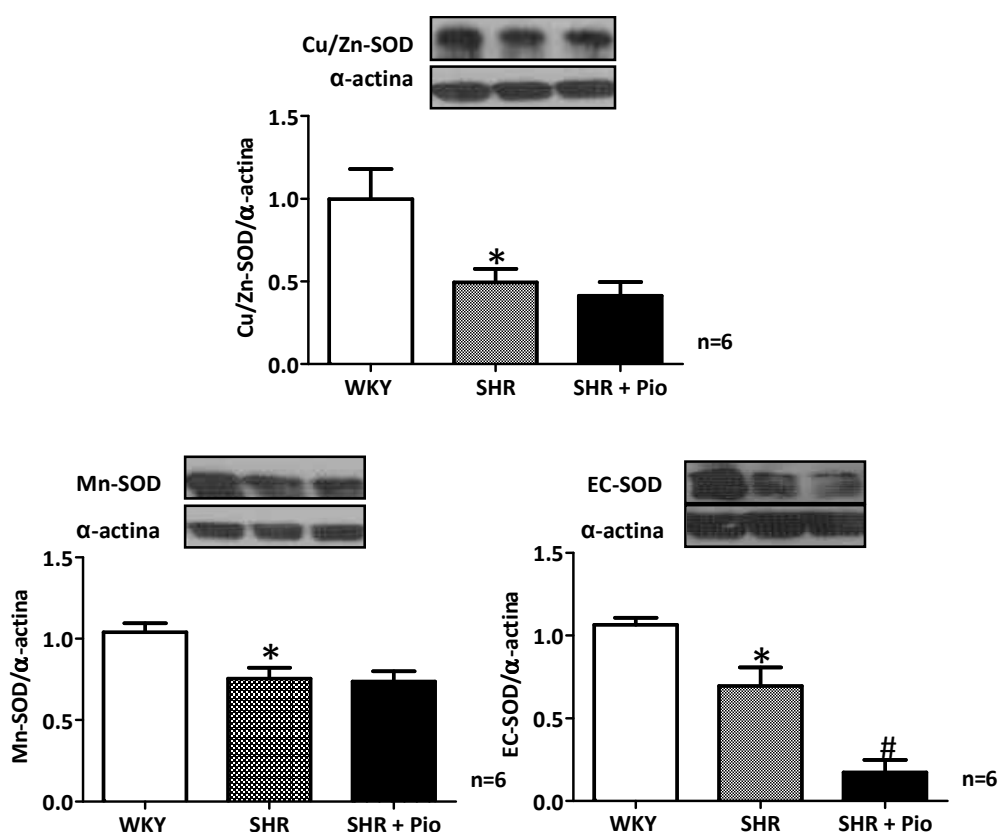


Fig. 88: Expresión de las proteínas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y EC-SOD en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La parte superior de la figura muestra un blot representativo. La expresión se normalizó utilizando α -actina. Los resultados (media \pm ES) se expresan como expresión relativa respecto a la expresión de WKY. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR, por *t* de Student no pareada. n indica el número de animales.

A continuación analizamos los niveles de catalasa, enzima que cataliza la transformación de H_2O_2 en agua y oxígeno. Los niveles de ARNm de catalasa fueron similares en arterias de ratas normotensas y de ratas hipertensas. El tratamiento con pioglitazona incrementó significativamente el ARNm de catalasa (Fig. 89).

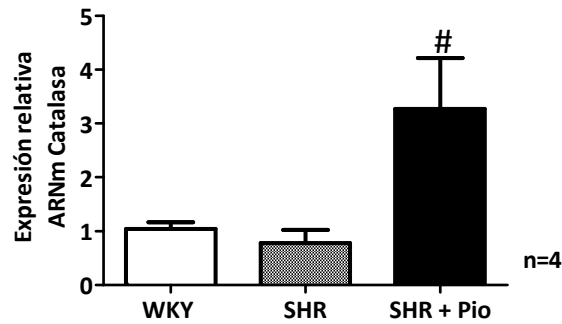


Fig. 89: Expresión relativa del ARNm de catalasa en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La expresión se normalizó utilizando β_2 -microglobulina como control endógeno. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. [#] $p < 0,05$ vs SHR por t de Student no pareada. n indica el número de animales.

2.6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA

Se ha descrito que el NO modula las respuestas vasoconstrictoras y que el aumento en el estrés oxidativo observado en la hipertensión puede reducir la biodisponibilidad del NO y contribuir a las respuestas vasculares alteradas encontradas en esta patología (Dowell y cols., 1999). De acuerdo con esto, la incubación de los segmentos de arterias mesentéricas de resistencia con el inhibidor no selectivo de la NOS, L-NAME (100 μ M), que compite por el sitio de unión del enzima con el sustrato, L-Arginina, potenció la respuesta a fenilefrina en segmentos procedentes de ratas WKY y SHR. Este efecto fue menor en SHR, como muestra el análisis de la diferencia del área bajo la curva concentración-respuesta (Fig. 90). En ratas SHR tratadas con pioglitazona, L-NAME también incrementó la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina; sin embargo, el análisis de las diferencias de área bajo la curva muestra que este efecto fue mayor que el observado en arterias de ratas SHR sin tratar (Fig. 90), sugiriendo que el

tratamiento con pioglitazona incrementa la modulación de la respuesta a fenilefrina por parte del NO.

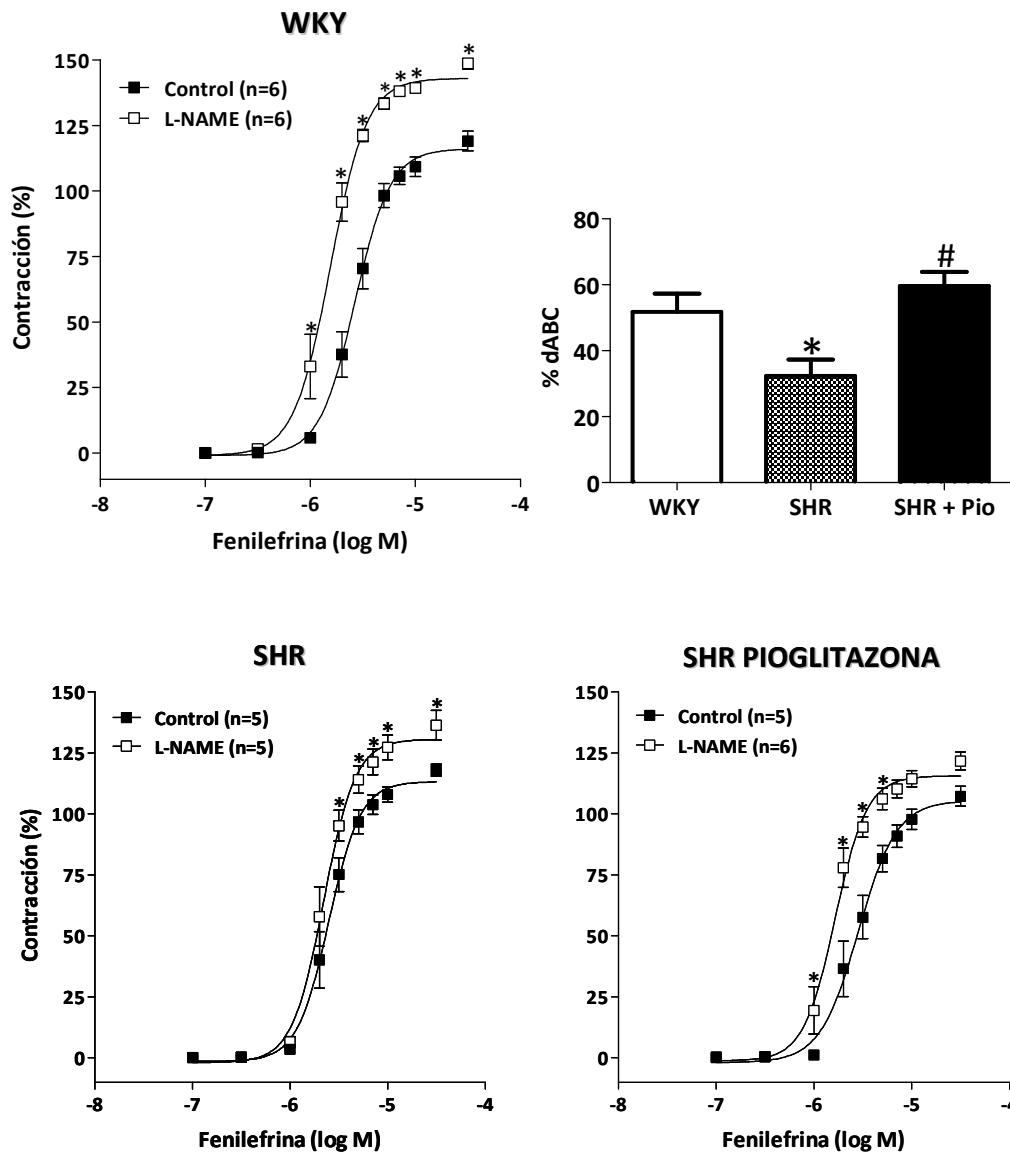


Fig. 90: Efecto de L-NAME (100 μ M) sobre la curva concentración-respuesta a fenilefrina en segmentos de arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). Los resultados (media \pm ES) están expresados en porcentaje de la contracción inducida por K^+ -KHS. * $p < 0,05$ vs control, ANOVA (dos-vías) seguido de análisis de Bonferroni. Los histogramas (media \pm ES) muestran las diferencias de área bajo la curva a fenilefrina (dABC) en ausencia y presencia de L-NAME, representadas como porcentaje del ABC de situación control. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR, por t de Student no pareada. n indica el número de animales.

2.6.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de eNOS

Una vez determinado que el tratamiento con pioglitazona aumentaba la participación del NO en la respuesta a fenilefrina, determinamos si este aumento se debía a la mayor expresión de la isoforma endotelial de la NOS, eNOS. La expresión de eNOS fue similar en arterias mesentéricas de resistencia de ratas normotensas e hipertensas; el tratamiento con pioglitazona no modificó la expresión del enzima (Fig. 91).

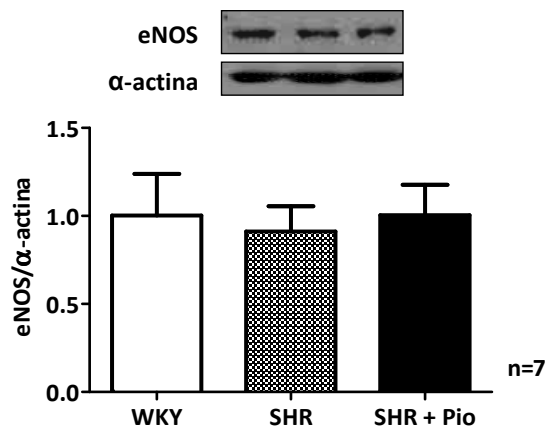


Fig. 91: Expresión de la proteína eNOS por Western Blot en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR no tratadas y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La expresión se normalizó utilizando α-actina. Los resultados están expresados como media ± ES. n indica el número de animales.

2.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE PPAR

Se ha descrito que la expresión de los PPAR está modificada con la hipertensión, y que estos cambios podrían contribuir a explicar algunas de las características de esta patología como la incrementada proliferación, migración e inflamación (Li y cols., 2010; Zhang y cols., 2010). Los niveles de ARNm de PPAR γ fueron menores en arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR que en WKY. El tratamiento de SHR con pioglitazona aumentó significativamente los niveles de ARNm de PPAR γ (Fig. 92).

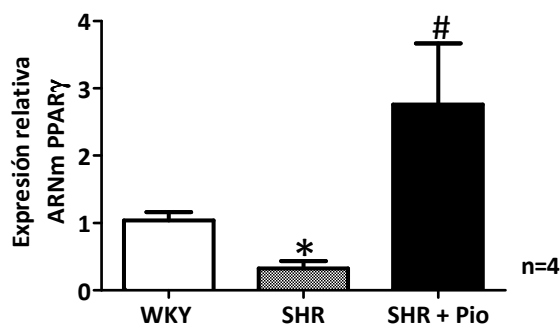


Fig. 92: Expresión relativa del ARNm de PPAR γ en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La expresión se normalizó utilizando β_2 -microglobulina como control endógeno. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. * $p < 0,05$ vs WKY y # $p < 0,05$ vs SHR, por *t* de Student no pareada. n indica el número de animales.

En cuanto a los niveles de ARNm de PPAR α , éstos fueron similares en arterias de ratas WKY y SHR. El tratamiento de SHR con pioglitazona no modificó los niveles de ARNm de PPAR α (Fig. 93).

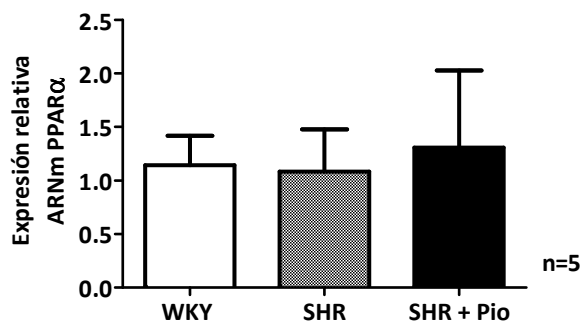


Fig. 93: Expresión relativa del ARNm de PPAR α en arterias mesentéricas de resistencia de ratas WKY y SHR sin tratar y tratadas con pioglitazona durante 28 días (Pio, 2,5 mg/Kg x día). La expresión se normalizó utilizando β_2 -microglobulina como control endógeno. Los resultados (media \pm ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles en WKY. n indica el número de animales.

DISCUSIÓN

Con la hipertensión se han descrito alteraciones en la actividad y en la expresión de COX-2, isoforma inducible de la COX (García-Cohen y cols., 2000; Davidge, 2001), sugiriendo una alteración en la producción de prostanoïdes a partir de esta isoforma en dicha patología. Además, en la hipertensión también se ha descrito un incremento de los niveles tanto plasmáticos como vasculares de citoquinas proinflamatorias circulantes, como IL-1 β (Sanz-Rosa y cols., 2005), así como de la capacidad de IL-1 β para inducir la expresión de COX-2 en distintos lechos vasculares (Mendez y Lapointe, 2003; Briones y cols., 2005b). La hipertensión, asimismo, se caracteriza por una alteración en la activación de proteínas generadoras de O₂⁻, como la NAD(P)H oxidasa, y/o en los niveles de sistemas antioxidantes, como las SODs (Zalba y cols., 2001; Polizio y Peña, 2005), que conduce a un aumento del estrés oxidativo, lo que explicaría la disminución de la biodisponibilidad de NO y la disfunción endotelial observada en esta patología. Por otra parte, se ha propuesto que la expresión de PPAR, receptores nucleares con propiedades antiinflamatorias, puede estar disminuida en vasos sanguíneos de animales hipertensos, lo que contribuiría al aumento en la proliferación, migración, inflamación y fibrosis, características de la hipertensión (Wu y cols., 2004). Todas estas alteraciones podrían ser responsables de las alteraciones en la liberación de factores que modulan el tono vascular y de esta manera contribuir a la génesis y/o mantenimiento de la hipertensión.

1. TRATAMIENTO AGUDO CON AGONISTAS PPAR γ DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

1.1. EFECTO DE IL-1 β SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2

Como ya comentamos, COX cataliza el paso clave en la formación de prostanoïdes, conocidos mediadores de la respuesta inflamatoria. Además, COX-2, la isoforma inducible de la COX, está incrementada en condiciones patológicas e involucrada en patologías asociadas a procesos inflamatorios como la hipertensión (Adeagbo y cols., 2005; Alvarez y cols., 2005; Viridis y cols., 2009). El análisis de la expresión proteica de COX-2 en condiciones basales no mostró diferencias entre CMLV procedentes de aorta de WKY y de SHR, lo que estaba de acuerdo con la similar expresión de ARNm descrita

previamente por nuestro grupo en este tipo celular (Pérez Girón, 2009). Estos resultados difieren de los obtenidos previamente en arteria mesentérica y aorta (Briones y cols., 2002b; Alvarez y cols., 2005), donde se observaron niveles mayores de expresión de esta proteína en SHR que en WKY. Esta diferencia puede explicarse por la existencia de distintos tipos celulares en el vaso entero, así como por la notable diferencia entre la situación *in vivo* e *in vitro*, ya que los vasos de los animales hipertensos están expuestos crónicamente a niveles elevados de citoquinas y de otros mediadores proinflamatorios como la Ang II, algo que no ocurre en los cultivos celulares. Así, la mayor expresión de COX-2 descrita en arterias mesentéricas y aorta de SHR sugiere una relación con los niveles de citoquinas y mediadores proinflamatorios circulantes, otorgando a éstos un papel clave en la regulación de la expresión de esta enzima y, por lo tanto, en la inflamación vascular y en las alteraciones funcionales y estructurales asociadas a la hipertensión. De esta manera, la activación de COX-2 por citoquinas proinflamatorias como IL-1 β en la pared vascular podría contribuir al proceso inflamatorio y a las alteraciones vasculares encontradas en hipertensión. De hecho, la capacidad de la IL-1 β para inducir la expresión de COX-2, se ha descrito en distintos lechos vasculares incluyendo arterias coronarias (Bishop-Bailey y cols., 1998), mesentéricas (Briones y cols., 2005b) y cerebrales (Lacroix y Rivest, 1998), al igual que en cultivos de CMLV (Jiang y cols., 2004; Kang y cols., 2008), células endoteliales (Uracz y cols., 2002), fibroblastos (Farrajota y cols., 2005), células mesangiales (Sawano y cols., 2002), condrocitos (Wang y cols., 2010) y cardiomiocitos (Mendez y Lapointe, 2003). Puesto que los niveles de citoquinas, como IL-1 β , están aumentados en SHR (Sanz-Rosa y cols., 2005) nos planteamos analizar si en la hipertensión están alterados los mecanismos proinflamatorios activados por esta citoquina. Para ello se estimularon los cultivos de CMLV de ambas cepas con dicha citoquina durante 24 h y observamos un incremento de la expresión de la proteína COX-2, que fue mayor en cultivos procedentes de SHR que de WKY, lo que estaba de acuerdo con la mayor expresión de ARNm descrita previamente por nuestro grupo en este tipo celular (Pérez Girón, 2009).

1.2. EFECTO DE IL-1 β SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ROS, entre las que se encuentran el O₂⁻ y el H₂O₂, participan como segundos mensajeros en el crecimiento, migración y supervivencia de las células del músculo liso así como en el remodelado de la pared del vaso, sugiriendo que tanto las fuentes de ROS como las vías de señalización en las que participan quizá representen importantes dianas terapéuticas en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, donde se han observado niveles elevados de ROS (Griendling y cols., 2000; Taniyama y Griendling, 2003; Pauletto y Rattazzi, 2006; Paravicini y Touyz, 2006; 2008; Marchesi y cols., 2008; Harrison y Gongora, 2009). Como ya comentamos, la NAD(P)H oxidasa es la principal fuente generadora de ROS en células vasculares (Beswick y cols., 2001a; Touyz y Schiffrin, 2004; Dikalov y cols., 2008). Cuando analizamos la actividad basal del complejo enzimático NAD(P)H oxidasa observamos que era mayor en SHR que en WKY. Resultados similares han sido descritos en CMLV de aorta de rata (Zalba y cols., 2000). En AMR, Briones y cols. (2011) también han observado mayor actividad en SHR que en WKY y sugieren que la *upregulación* de las isoformas NOX quizá contribuya a la incrementada actividad de la NAD(P)H oxidasa en SHR, al menos en condiciones basales. De hecho, nuestro grupo ha descrito mayores niveles de ARNm de NOX-1 en CMLV de SHR comparado con WKY (Pérez Girón, 2009). En línea con estos resultados, Chan y cols. (2009) observaron que las ratas SHR presentaban una producción aumentada de O₂⁻ derivado de la NAD(P)H oxidasa comparado con las WKY en médula ventrolateral rostral, lo cual contribuía a la hipertensión y al aumentado tono vasomotor simpático observado en esta cepa.

En varios tipos celulares, incluyendo células vasculares, se ha descrito un incremento en la producción de ROS inducido por citoquinas proinflamatorias como IL-1 β (Meier y cols., 1989; Bowie y O'Neill, 2000; Mendes y cols., 2003) o TNF- α (Meier y cols., 1989; Bowie y O'Neill, 2000; Manea y cols., 2010) así como por Ang II (Rajagopalan y cols., 1996; Briones y cols., 2011). Uno de los mecanismos por el que estos estímulos podrían contribuir al aumento en el estrés oxidativo e inflamación vascular asociada a la hipertensión sería a través del aumento en la producción de ROS por la NAD(P)H

oxidasa. Tras 24 h de incubación con IL-1 β , se observó un incremento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa en cultivos de CMLV de ambas cepas, que fue mayor en WKY que en SHR, de modo que al final del periodo de estimulación los niveles de cepas se igualaron. Estos resultados están de acuerdo con el mayor aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa encontrado por Briones y cols. (2011) en WKY tras la estimulación con Ang II. Las CMLV expresan principalmente las isoformas de la NAD(P)H oxidasa NOX-1, NOX-2 y NOX-4 (Griendling, 2004; Manea y cols., 2010; Briones y cols., 2011). Numerosos factores de crecimiento tales como Ang II o PDGF, citoquinas, estrés mecánico y mediadores proinflamatorios inducen estas subunidades tanto *in vivo* como *in vitro* (Matsuno y cols., 2005; Dikalov y cols., 2008; Briones y cols., 2011), de manera que dichas subunidades están emergiendo como reguladores importantes de las vías celulares en los procesos fisiológicos y patológicos dependientes de ROS. De las diversas subunidades que forman parte de la NAD(P)H oxidasa, NOX-1 parece ser la principal subunidad implicada en el incremento de estrés oxidativo inducido por citoquinas, de modo que alteraciones en su expresión podrían contribuir a explicar el aumento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa, el estrés oxidativo y la presión arterial descrito en hipertensión (Matsuno y cols., 2005). Un aumento en la expresión proteica de NOX-1 ha sido observado por Miller y cols. (2007) en CMLV humanas estimuladas con IL-1 β y TNF- α y por Briones y cols. (2011) en CMLV de rata tras la estimulación Ang II. En el presente trabajo encontramos que la estimulación con IL-1 β incrementa la expresión de NOX-1. Este incremento fue similar en cultivos de CMLV procedentes de ratas hipertensas y normotensas, de acuerdo con el similar incremento en los niveles de ARNm de NOX-1 tras la estimulación con IL-1 β previamente descrito (Pérez Girón, 2009).

A continuación comprobamos si el aumento inducido por IL-1 β , tanto en la expresión de la subunidad NOX-1 como en la actividad del enzima, se acompañaba de un aumento en la producción de ROS. Por ello, analizamos la producción de O₂⁻ y comprobamos que, efectivamente, esta citoquina incrementaba su producción en CMLV de ratas WKY y SHR. Resultados similares han sido descritos por otros autores tras la estimulación con mediadores proinflamatorios como IL-1 β (Jiménez-Altayó y cols., 2006), Ang II (Briones y cols., 2011) o LPS (Hernanz y cols., 2003; Peng y cols.,

2005). También analizamos la producción de H_2O_2 tras el tratamiento con IL-1 β y observamos un aumento de esta ROS sólo en células de animales hipertensos. Similares resultados obtuvieron Cheng y cols. (2005) y Cao y cols. (2006) quienes observaron que en músculo circular de esfínter esofágico IL-1 β inducía la producción de peróxido de hidrógeno. Tras la inhibición de la NAD(P)H oxidasa con apocinina se redujeron los niveles de H_2O_2 inducidos por IL-1 β , lo que nos permite concluir que el H_2O_2 se genera, al menos en parte, por la activación de la NAD(P)H oxidasa inducida por IL-1 β , al igual que ocurre con otros estímulos inflamatorios como Ang II (Cai y cols., 2002). Asimismo, Mendes y cols. (2003) observaron que la inhibición de la producción de ROS, concretamente la supresión de la síntesis de H_2O_2 por yoduro de difenileno (DPI), un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa, es una estrategia efectiva para prevenir la activación de AP-1 inducida por IL-1 β en condrocitos, confirmando que parte del H_2O_2 responsable de este efecto provenía de la actividad de la NAD(P)H oxidasa. Sin embargo, aunque la NAD(P)H oxidasa puede producir H_2O_2 como un producto inicial (Dikalov y cols., 2008), la mayoría del H_2O_2 deriva de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ por acción de las SODs celulares. Por otra parte, existen datos que sugieren la existencia de un bucle de retroalimentación positivo entre el estrés oxidativo generado por la NAD(P)H oxidasa y la expresión y actividad de la propia enzima. Así, el $O_2^{\cdot-}$ generado por la NAD(P)H oxidasa puede ser transformado en H_2O_2 , ROS que a su vez también podría activar la NAD(P)H oxidasa (Seshiah y cols., 2002). Además, la aplicación exógena de H_2O_2 activa la NAD(P)H oxidasa produciendo $O_2^{\cdot-}$ en CML de aorta de ratas Sprague-Dawley, en fibroblastos vasculares de aorta de ratón, en arteria coronaria humana y en AMR de SHR (Li y cols., 2001; García-Redondo y cols., 2009b).

1.3. PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN EL EFECTO DE IL-1 β SOBRE COX-2

El estrés oxidativo puede inducir la expresión y actividad de COX-2, habiéndose sugerido una relación entre la expresión de COX-2 y la actividad NAD(P)H oxidasa tras la exposición a varios estímulos. Así, en células mesangiales de rata, Feng y cols. (1995) demostraron que el estrés oxidativo inducido por IL-1 β , TNF- α y LPS estimulaba los niveles del ARNm y proteína de COX-2 sin alterar los niveles de COX-1. Asociado al

incremento en la actividad de la NAD(P)H oxidasa se ha descrito también un incremento en la expresión de COX-2 en cardiomiocitos estimulados con LPS (Peng y cols., 2005), en células mesangiales estimuladas con Ang II (Jaimes y cols., 2005), en CMLV de aorta de ratas SHR estimuladas con Ang II (Alvarez y cols., 2007) y en células de músculo circular de esfínter esofágico estimuladas con IL-1 β (Cao y cols., 2006). Como se ha mencionado, en este trabajo IL-1 β incrementa la expresión de NOX-1, la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la producción de O₂⁻ y H₂O₂. Además, hemos encontrado que los inhibidores de la NAD(P)H oxidasa apocinina y de la xantina oxidasa alopurinol reducen la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en ambas cepas, sugiriendo la implicación del aumento en el estrés oxidativo en la inducción de COX-2. Ohtsubo y cols. (2004) observaron que también la xantina es un regulador endógeno de la COX-2 en inflamación. Aunque Williams y Griendling (2007) describieron que la apocinina era un inhibidor de la NAD(P)H oxidasa que previene el ensamblaje de las subunidades p47phox y gp91phox resultando en la disminución de la formación de O₂⁻ dependiente de NAD(P)H oxidasa, recientemente se ha descrito que la apocinina también es capaz de reducir la biodisponibilidad de ROS a través de sus propiedades antioxidantes independientemente de su capacidad para inhibir la NAD(P)H oxidasa (Heumüller y cols., 2008). Nosotros observamos que las ROS están implicadas en la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en CMLV de WKY y SHR, aunque no conocemos el mecanismo exacto de la apocinina en nuestro modelo experimental.

Por otra parte, catalasa reduce la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en SHR, pero no en WKY, comprobando la participación de H₂O₂ en la expresión de COX-2 en células de ratas hipertensas pero no de normotensas. Como se ha comentado en la introducción, el H₂O₂ es un segundo mensajero intracelular que interacciona con múltiples vías de señalización activando rutas celulares implicadas en el aumento de la expresión de citoquinas como TNF- α (Nakao y cols., 2008), de marcadores de inflamación como ICAM-1 (Lo y cols., 1993) y de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Feng y cols., 1995; Nakamura y Sakamoto, 2001; Jaimes y cols., 2005; Lu y Wahl, 2005; Cao y cols., 2006). De acuerdo con estos resultados, encontramos que la adición exógena de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo de células de SHR induce la expresión de COX-2. Previos resultados de nuestro grupo han demostrado asimismo un

aumento del ARNm de COX-2 tras H₂O₂ que se reducía con catalasa, confirmando la especificidad del efecto del H₂O₂ sobre la expresión de COX-2 (Pérez Girón, 2009).

Nuestros resultados, por tanto, confirman la relación entre la producción de anión superóxido, al menos en parte, por la NAD(P)H oxidasa y/o xantina oxidasa y el incremento en la expresión de COX-2 inducido por IL-1 β en ambas cepas y además, en animales hipertensos, el incremento de H₂O₂ contribuye a la incrementada expresión de COX-2 por IL-1 β .

1.4. PARTICIPACIÓN DE NF- κ B EN EL EFECTO DE IL-1 β Y H₂O₂ SOBRE COX-2

Las ROS incrementan la expresión de una gran cantidad de moléculas implicadas en el aumento del estado inflamatorio como citoquinas y enzimas productoras de mediadores inflamatorios, debido a su capacidad para activar factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 o STATs (Simon y cols., 1998; Bowie y O'Neill, 2000; Mendes y cols., 2003; Grau y cols., 2004; Lu y Wahl, 2005; Paravicini y cols., 2006) y de MAPKs como JNK, p38 o ERK 1/2 (Lo y cols., 1996; LaPointe e Isenović, 1999), aunque algunos autores han observado que H₂O₂ no activa NF- κ B (Korn y cols., 2001), o incluso que puede reducir la activación de NF- κ B inducida por LPS (Carballo y cols., 1999) o TNF- α (Korn y cols., 2001). Muchas de estas vías de señalización reguladas por ROS participan en la expresión de COX-2 (Beltrán y cols., 2009; Galán y cols., 2011). NF- κ B es una familia ubicua de factores de transcripción que regulan la respuesta inflamatoria por controlar la expresión de genes como COX-2 e iNOS, mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y moléculas de adhesión como VCAM-1 y P-selectina (Kabe y cols., 2005; Sung y cols., 2006; Klein y cols., 2007). NF- κ B consiste en dímeros compuestos de las subunidades p65 y p50 o p52. En células en reposo, NF- κ B está secuestrado en el citoplasma por la asociación con la proteína inhibitoria I κ B. Tras estimulación, la quinasa de I κ B (IKK) se activa y fosforila a I κ B, la cual se ubiquitina y es degradada en el proteasoma, permitiendo a NF- κ B translocarse al núcleo y ejercer sus funciones como factor de transcripción (Kabe y cols., 2005). En CMLV de ratas SHR, la IL-1 β aumentó la expresión nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B, así como la fosforilación de IKK. Ambos efectos fueron inhibidos por apocinina, sugiriendo la participación de ROS en el aumento de la actividad de NF- κ B inducido por IL-1 β . Para demostrar el papel

de NF- κ B en la expresión de COX-2 utilizamos lactacistina, un inhibidor del proteasoma, y por tanto, inhibidor de la activación de NF- κ B. Este compuesto fue capaz de bloquear la inducción de COX-2 estimulada por IL-1 β ; además, lactacistina inhibió la expresión de COX-2 inducida por la adición exógena de H₂O₂. Lu y Wahl (2005) demostraron que en monocitos humanos H₂O₂ provoca la translocación de NF- κ B al núcleo por degradación de I κ B α , causando *upregulación* del factor de transcripción e incrementando la expresión y actividad de la proteína COX-2. A su vez, NF- κ B podría regular la producción de ROS. Así, Manea y cols. (2010) han demostrado que NF- κ B regula la expresión de NOX-1 y NOX-4 (subunidades de la NAD(P)H oxidasa que presentan en su región promotora elementos típicos de NF- κ B) y de las enzimas detoxificantes Cu/Zn-SOD y Mn-SOD en células del músculo liso de aorta humana estimuladas por TNF- α . De nuestros resultados podemos concluir que la vía de señalización de NF- κ B participa en la inducción de COX-2 por ROS, aunque no podemos descartar su papel en la producción de dichas ROS.

El resumen de los resultados presentados hasta el momento se muestra en la figura 94. En WKY la IL-1 β incrementa la producción de O₂⁻ por mecanismos que implican la inducción de la enzima NAD(P)H oxidasa y/o xantina oxidasa. En SHR la IL-1 β incrementa la expresión del factor redox-sensible NF- κ B por mecanismos que implican la producción de O₂⁻ y además de H₂O₂ derivados de la activación de la NAD(P)H oxidasa y/o xantina oxidasa. Este incremento en el estrés oxidativo contribuye a la inducción de la expresión de COX-2 por IL-1 β en WKY y SHR.

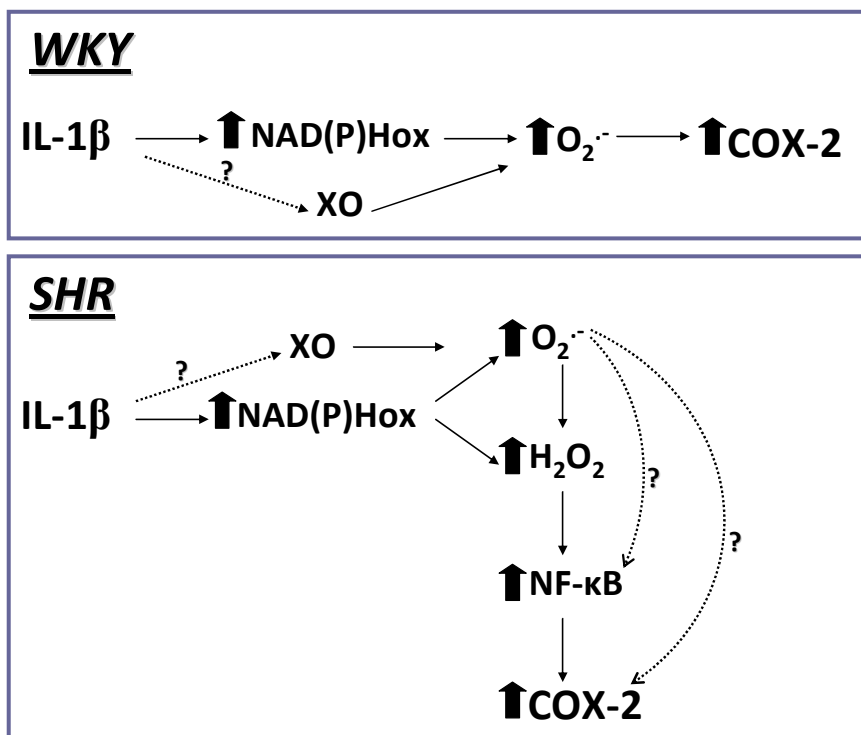


Fig. 94: Mecanismo propuesto para explicar la regulación positiva de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV de WKY y SHR. COX-2: ciclooxigenasa-2; IL-1β: interleuquina-1β; NAD(P)H oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NF-κB: factor nuclear activador de la síntesis de la cadena ligera κ de linfocitos B; XO: xantina oxidasa.

1.5. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR PPAR EN CMLV DE RATAS WKY y SHR

Aunque la primera demostración del papel de los PPAR en procesos inflamatorios tuvo lugar en ratones deficientes para PPARα, que presentaban una respuesta prolongada a estímulos inflamatorios (Devchand y cols., 1996), también PPARγ regula la respuesta inflamatoria (Ricote y cols., 1998). Así, en diversas condiciones inflamatorias se ha observado una reducción de la expresión de PPARγ (Zingarelli y cols., 2003; Wu y cols., 2004; El Midaoui y cols., 2006; Zhang y cols., 2010) y, como comentaremos más adelante, la expresión reducida del ARNm de PPARγ en AMR de ratas hipertensas también podría relacionarse con un aumento del estado inflamatorio, como ya han descrito otros autores en diferentes vasos de SHR (Chan y cols., 2010; Li y cols., 2010; Zhang y cols., 2010).

Una vez demostrada la participación de las ROS en la expresión de COX-2 inducida por IL-1β, analizamos si los agonistas PPAR pueden modular la expresión de COX-2 inducida

por IL-1 β y los mecanismos implicados en esta regulación. Para ello estudiamos: 1) los efectos de los agonistas PPAR α y PPAR γ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β ; 2) los efectos del agonista PPAR γ pioglitazona sobre la producción de ROS inducida por IL-1 β ; y 3) los efectos de pioglitazona en la activación de NF- κ B en CMLV.

1.5.1 Efecto de los agonistas PPAR α y PPAR γ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β

La activación de PPAR α con fenofibrato no modificó la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en CMLV de ratas normotensas e hipertensas, descartando un papel regulador de esta isoforma de PPAR en la expresión de dicha enzima. Los datos que existen en relación con la regulación de la expresión de COX-2 por PPAR α son contradictorios. Así, Blanco-Rivero y cols. (2007) observaron en aorta de ratas Wistar tratadas con fenofibrato un incremento en la expresión de COX-2 y en la producción de PGE₂, al tiempo que se reducía la producción de PGI₂, lo que se asociaba al desarrollo de disfunción endotelial. Oshio y cols. (2008) también observaron que agonistas PPAR α activan la transcripción de COX-2 en líneas celulares de colon humano. Por el contrario, en CMLV de aorta humana el incremento en la expresión de COX-2 inducido por IL-1 β (Staels y cols., 1998; Rival y cols., 2009) o por Ang II (Hu y cols., 2002) se reduce por la activación de PPAR α . Por su parte, Diep y cols. (2002a), en arterias mesentéricas de ratas infundidas con Ang II, observaron que el tratamiento crónico con fenofibrato reduce la actividad de la NAD(P)H oxidasa mientras que Teissier y cols. (2004) observaron la capacidad de Wy14643 para activar la NAD(P)H oxidasa y el estrés oxidativo en macrófagos. Sin embargo, los estudios llevados a cabo por Nakajima y cols. (2010) muestran que el tratamiento de ratones con bezafibrato no modifica el estrés oxidativo hepático. A la vista de la diversidad de resultados podemos concluir que la regulación de la expresión de COX-2 por PPAR α también parece ser específica del tipo celular, del estímulo utilizado y condiciones experimentales. Así, aunque en nuestro estudio fenofibrato no modifica la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en CMLV de WKY y SHR, no se puede descartar que la activación de PPAR α ejerza otros efectos vasculares beneficiosos ya que el tratamiento con agonistas PPAR α ha sido eficaz en la inhibición de la síntesis de ADN, del fenotipo hiperproliferativo e incluso de la

migración celular en presencia de estímulos proinflamatorios como Ang II e IL-1 β (Hu y cols., 2002).

La relación entre la expresión de COX-2 y la activación de PPAR γ es un hecho ampliamente documentado en distintos tipos celulares y tejidos y, al igual que PPAR α , con resultados contradictorios. Así, se ha observado tanto una reducción de COX-2 por agonistas PPAR γ (Inoue y cols., 2000; Han y cols., 2003; Mendez y LaPointe, 2003), como un aumento (Fahmi y cols., 2002; Kalajdzic y cols., 2002; Kang y cols., 2008) o incluso ausencia de modulación (Konturek y cols., 2003). En nuestro estudio, la activación de PPAR γ con tres agonistas, rosiglitazona, 15d-PGJ₂ o pioglitazona aumentó la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR. Resultados similares hemos observado en fibroblastos de aorta de SHR tratados con pioglitazona, como veremos más adelante, así como en HUVEC (resultados no mostrados). Se ha descrito la presencia en el extremo 5' del promotor de COX-2 de un elemento de respuesta a PPAR (PPRE) que puede explicar el incremento en la expresión y/o actividad de COX-2 asociado a la activación de PPAR γ , como ya han descrito otros autores (Meade y cols., 1999; Pontsler y cols., 2002; Bishop-Bailey y Warner, 2003).

En diversos modelos inflamatorios los agonistas PPAR γ reducen la incrementada expresión de COX-2. Así, la expresión de COX-2 y la producción de PGE₂ inducidas por LPS, IL-1 β o PMA se inhiben por 15d-PGJ₂ en distintos tipos de cultivos celulares, incluyendo hepatocitos fetales de rata (Callejas y cols., 1999), condrocitos humanos osteoartóricos (Fahmi y cols., 2002), células de carcinoma de colon humanas (Grau y cols., 2004), fibroblastos sinoviales humanos (Farrajota y cols., 2005) y células mesangiales de rata (Sánchez-Gómez y cols., 2004). En este mismo sentido, diversos autores han encontrado que el tratamiento con rosiglitazona reduce la expresión de COX-2 en un modelo de colitis ulcerosa inducida por ácido trinitrobenzensulfónico (Sánchez-Hidalgo y cols., 2005), así como en ratas hipertensas o ratones diabéticos (Tureyen y cols., 2007), y que pioglitazona es eficaz en la reducción de la expresión de COX-2 en la patología isquémica (Zhao y cols., 2006). El hecho de que un producto del metabolismo de COX-2 como 15d-PGJ₂ reduzca la expresión de COX-2, sugiere un *feedback* autorregulatorio que contribuiría a la resolución natural de la respuesta

inflamatoria (Inoue y cols., 2000; Scher y Pillinger, 2005). También se ha descrito que la sobreexpresión de PPAR por ligandos PPAR γ endógenos y sintéticos disminuye la expresión elevada de COX-2 asociada con cáncer cervical (Han y cols., 2003) y de pulmón (Bren-Mattison y cols., 2008). Sin embargo, otros autores han observado que la activación de PPAR γ aumenta la expresión de COX-2 estimulada por citoquinas (Bishop-Bailey y Warner, 2003; Kang y cols., 2008). En nuestro estudio, los tres agonistas PPAR γ utilizados, rosiglitazona, 15d-PGJ₂ y pioglitazona, redujeron la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β tanto en WKY como en SHR. Previamente en nuestro grupo habíamos observado que el silenciamiento de PPAR γ aumentaba la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β , sugiriendo que PPAR γ interfiere con la expresión de esta enzima proinflamatoria; por otra parte, habíamos descrito que pioglitazona aumentaba los niveles de ARNm de PPAR γ inducidos por IL-1 β en CMLV de SHR (Pérez Girón, 2009). En el presente trabajo hemos observado que en células estimuladas con IL-1 β donde se había silenciado el gen de PPAR γ , pioglitazona también aumenta la expresión de este receptor, al tiempo que reduce la de COX-2, confirmando la relación inversa entre PPAR γ y COX-2. Otros investigadores también han encontrado expresión incrementada de PPAR γ usando rosiglitazona y pioglitazona (Sommer y Wolf, 2007; Lee y cols., 2009), sugiriendo que el incremento en la actividad de PPAR γ inducido por sus agonistas puede ser un mecanismo celular represor de la expresión de COX-2 que contribuye a la respuesta antiinflamatoria a nivel vascular.

Como hemos comentado en células estimuladas con IL-1 β , los agonistas PPAR γ reducen la expresión de COX-2 mientras que en ausencia de estímulo se observa un aumento en dicha expresión. Estas discrepancias podrían deberse a los mecanismos de señalización específicos involucrados en la expresión de COX-2 en cada caso. Así, tras la estimulación con IL-1 β se encuentran activados factores de transcripción como NF- κ B que participan en la inducción de COX-2 y cuya activación es inhibida por PPAR γ , como se discutirá más adelante. En cambio, en ausencia de estímulo inflamatorio, el nivel de activación de estos factores de transcripción es menor. En la línea de nuestros resultados están los de Fahmi y cols. (2002) en condrocitos osteoartríticos humanos y los de Paik y cols. (2000) en células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29), quienes observaron que 15d-PGJ₂ ejercía una acción dual sobre la expresión de COX-2;

así, por un lado, aumentaba la expresión de COX-2 en ausencia de cualquier inductor del enzima, mientras que disminuía su expresión cuando las células se estimulaban con un agente proinflamatorio como IL-1 β , TNF- α . Por su parte, Paik y cols. (2000) sugieren que la inhibición por PPAR γ de la activación de NF- κ B inducida por estímulos inflamatorios, como TNF- α , resulta en la inhibición de la expresión de COX-2, hecho que no ocurre en ausencia de estímulos proinflamatorios.

1.5.2. Efecto del agonista PPAR γ pioglitazona sobre la producción de ROS inducida por IL-1 β

Como se ha discutido con anterioridad, un aumento en el estrés oxidativo contribuye al aumento de la expresión de COX-2 observado en CMLV tras el estímulo de IL-1 β . Los agonistas PPAR γ reducen el estrés oxidativo a nivel vascular, lo que se ha asociado con las acciones cardiovasculares beneficiosas descritas para estos agonistas en distintos modelos animales y en humanos (Sung y cols., 2006; Touyz y Schiffrin, 2006). Por ello, analizamos si la reducción de la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β por los activadores PPAR γ en CMLV de WKY y SHR se debía a su capacidad de reducir los niveles de ROS. Efectivamente, hemos observado que el tratamiento de las CMLV con pioglitazona reduce la expresión de NOX-1 y la actividad de la NAD(P)H oxidasa y en células de WKY y SHR estimuladas con IL-1 β . Además, tras la activación de PPAR γ con pioglitazona, se reduce el incremento de la producción intracelular de O $_2^{\cdot-}$ inducido por IL-1 β en ambas cepas, así como de los niveles de H $_2$ O $_2$ en SHR. Estos resultados confirman que los agonistas PPAR γ disminuyen el estrés oxidativo inducido por IL-1 β , lo que participaría en la reducción de COX-2. El hecho de que tras silenciar PPAR γ se incrementa la expresión de NOX-1 en CMLV de SHR (Pérez Girón, 2009) corrobora esta posibilidad. Nuestros resultados son similares a los descritos por otros autores quienes han demostrado que el aumento del estrés oxidativo por diferentes agentes inflamatorios se reduce tras el tratamiento con glitazonas. Así, Lu y cols. (2010b) observaron en CMLV de aorta pulmonar humana que el incremento en la concentración de H $_2$ O $_2$ inducido por hipoxia se reducía en presencia de rosiglitazona. Por su parte, Chen y cols. (2004) observaron en fibroblastos cardiacos que la activación de PPAR γ por pioglitazona reducía la síntesis de colágeno tipo I inducida por Ang II de

forma dependiente de la reducción de los niveles de O_2^- y del nivel de activación de NF- κ B inducido por este péptido. Villegas y cols. (2004) mostraron que los efectos protectores que ejercía rosiglitazona en el estrés oxidativo inducido por isquemia-reperfusión era mediado por reducción de la actividad de xantina oxidasa y, en consecuencia, por reducir la generación de O_2^- . De forma similar, en células endoteliales estimuladas con LDL oxidadas, Ang II y TNF- α (Mehta y cols., 2003) y en CMLV aórticas tratadas con altas concentraciones de insulina y glucosa (El Midaoui y cols., 2006) la activación de PPAR γ también es responsable de la reducción de los niveles de O_2^- , apoyando la hipótesis de que la activación de PPAR γ contrarresta el estrés oxidativo que parece estar implicado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, tanto rosiglitazona, como 15d-PGJ₂, o pioglitazona redujeron la expresión de COX-2 inducida por H₂O₂. Previos resultados de nuestro grupo habían mostrado que H₂O₂ incrementaba la expresión de PPAR γ , lo que contribuiría a explicar la reducción de COX-2 (Pérez Girón, 2009). En esta misma línea están los resultados de Sommer y Wolf (2007) quienes observaron, en células epiteliales de riñón, que el tratamiento con rosiglitazona protegía del daño producido por H₂O₂. Por lo tanto, los agonistas PPAR γ , además de reducir la producción de ROS, son capaces de reducir su efecto. Varios autores han sugerido que H₂O₂ puede interferir con vías de señalización proinflamatorias ya que puede regular, entre otros, la expresión de IL-8, ICAM-1 o factores de transcripción redox-sensibles como AP-1 y NF- κ B (Lakshminarayanan y cols., 1998; Lu y Wahl, 2005). Como hemos comentado anteriormente, el efecto de H₂O₂ está mediado por NF- κ B por lo que si las glitazonas reducen la expresión y/o actividad de este factor de transcripción proinflamatorio se podría explicar la reducción en el incremento de COX-2.

1.5.3. Efecto de pioglitazona en la señalización NF- κ B

Son numerosos los trabajos que muestran la capacidad antiinflamatoria de los activadores PPAR γ por mecanismos de transrepresión interfiriendo con los factores de transcripción NF- κ B, STAT-1 o AP-1 (Ricote y cols., 1998; Li y cols., 2000; Subbaramaiah y cols., 2001; Sánchez-Hidalgo y cols., 2005; Bren-Mattison y cols., 2008), algunos de los

cuales son necesarios para la transcripción de genes proinflamatorios como COX-2 (Kabe y cols., 2005; Sung y cols., 2006; Klein y cols., 2007). En el presente estudio observamos que pioglitazona inhibe la expresión nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B y la fosforilación de IKK, que eran incrementadas por IL-1 β , mecanismos que estarían implicados en la reducción de la expresión de COX-2 por pioglitazona. Otros autores también han observado que la translocación nuclear de la subunidad p65 y/o p50 de NF- κ B se prevenía con agonistas PPAR γ como rosiglitazona y 2,4-TZD (Liu y cols., 2005; Sung y cols., 2006). Son varios los mecanismos propuestos por los que los agonistas PPAR γ pueden interferir con la activación de NF- κ B: la interacción física con p65, p50 o ambas (Sung y cols., 2006), la inhibición de la degradación de la proteína inhibitoria I κ B (Chung y cols., 2000; Sung y cols., 2006) o el aumento en su expresión (Delerive y cols., 2000), la inhibición de IKK (Straus y cols., 2000; Zingarelli y cols., 2003) o la interacción de PPAR γ con la proteína CREB, un coactivador que interactúa con p65 (Dubuquoy y cols., 2002). Por otra parte, Inoue y cols. (2000) han sugerido que durante el proceso inflamatorio, la producción de 15d-PGJ₂ *downregula* COX-2 a través de un *feedback* negativo que implica a PPAR γ y NF- κ B, haciendo posible una producción dinámica de prostaglandinas.

Se ha descrito que H₂O₂, por aumentar la activación de NF- κ B, causa incremento en la expresión y actividad de COX-2 (Lu y Wahl, 2005). Como hemos comentado previamente con el estímulo IL-1 β , en nuestro estudio, la reducción por glitazonas de la expresión de COX-2 inducida por H₂O₂ podría ser explicada también por mecanismos de transrepresión, ya que pioglitazona interfiere con el factor de transcripción NF- κ B, aunque son necesarios más estudios para demostrar esta hipótesis.

En la figura 95 se muestra el resumen de los resultados obtenidos tras la activación de PPAR γ . Así, en WKY la activación de PPAR γ por agonistas reduce la producción de O₂⁻ inducida por IL-1 β y, por consiguiente, la expresión de COX-2. En SHR además observamos que pioglitazona reduce la expresión del factor de transcripción redox-sensible NF- κ B al reducir la producción de O₂⁻ y H₂O₂, lo que contribuye a la reducción de la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β .

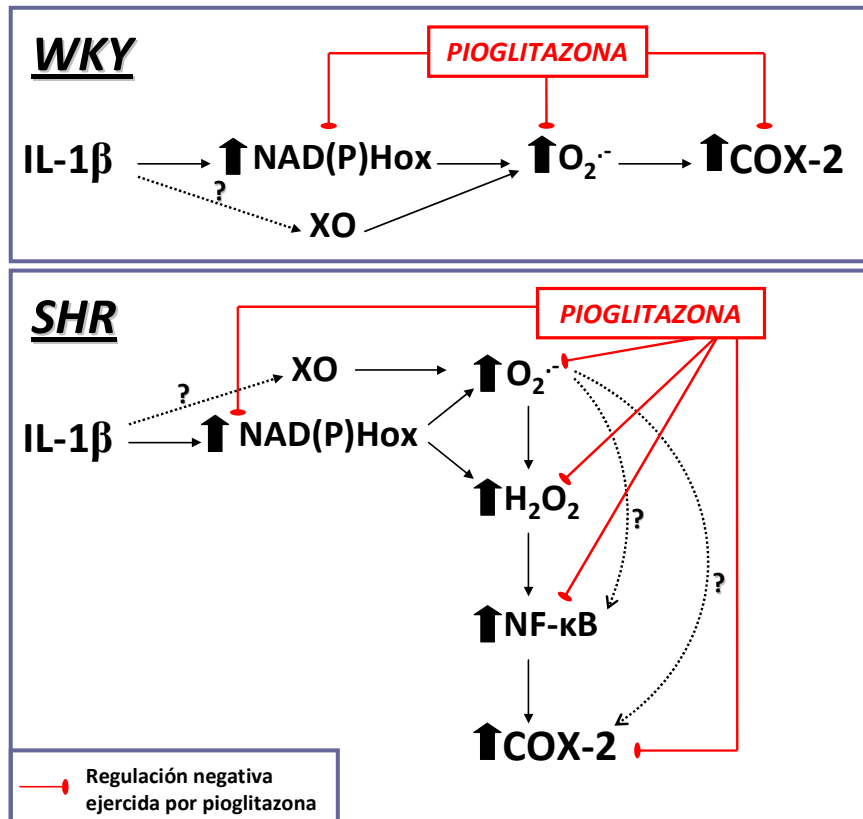


Fig. 95: Mecanismo propuesto para explicar la regulación negativa de la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en CMLV de WKY y SHR tras la activación de PPAR γ . COX-2: ciclooxigenasa-2; IL-1 β : interleuquina-1 β ; NAD(P)H oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NF- κ B: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; XO: xantina oxidasa.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la inflamación vascular contribuye al incremento en el estrés oxidativo descrito en la hipertensión. Así, la exposición de CMLV procedentes de WKY y SHR a IL-1 β incrementa los niveles de O₂^{·-} y/o H₂O₂, como consecuencia del incremento en la expresión de NOX-1 y en la actividad de la NAD(P)H oxidasa. El O₂^{·-} contribuye a la inducción de COX-2 en CMLV de ambas cepas, mientras que H₂O₂ contribuye específicamente al aumento de esta citoquina proinflamatoria sólo en la cepa hipertensa. Por su parte, PPAR γ desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria vascular. Los efectos observados con el activador PPAR γ pioglitazona en CMLV de WKY y SHR confirman que este receptor es clave en la reducción de la producción de ROS inducida por citoquinas y en la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2.

2. TRATAMIENTO CRÓNICO DE RATAS SHR CON PIOGLITAZONA

Una vez analizado el efecto *in vitro* del agonista PPAR γ pioglitazona sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en células vasculares de ratas normotensas e hipertensas, nos planteamos determinar los efectos que dicho agonista ejercía tras el tratamiento *in vivo* de ratas SHR.

2.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL

Como ya hemos comentado, las tiazolidinedionas son agonistas con alta afinidad por PPAR γ y comprenden una amplia familia de compuestos que regulan gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo glucídico y lipídico, la proliferación y diferenciación celular, además de regular múltiples procesos inflamatorios (Chen y cols., 2008). Se ha demostrado que el uso de glitazonas es eficaz en el tratamiento de diabetes mellitus, aterosclerosis e hipercolesterolemia (Tao y cols., 2003; Staels y Fruchart, 2005; Staels, 2007). Sin embargo, en la actualidad existe controversia acerca de los efectos antihipertensivos de estos fármacos. Así, en pacientes o en modelos animales con diabetes y/o otros factores del síndrome metabólico, tales como humanos obesos con resistencia a insulina, ratas Sprague-Dawley con hipertensión inducida por dieta, ratas Wistar diabéticas obesas o ratas Zucker obesas (Nolan y cols., 1994; Buchanan y cols., 1995; Yoshimoto y cols., 1997; Walker y cols., 1999) las glitazonas poseen efectos antihipertensivos. Aunque los agonistas PPAR γ pueden disminuir la expresión del receptor de Ang II, los niveles de ET-1 o modular los niveles del NO (Chen y cols., 2008), la bajada de presión arterial se relaciona fundamentalmente con una disminución de las concentraciones en plasma de insulina, ácidos grasos y glucosa (Ogihara y cols., 1995). Sin embargo, en pacientes o en modelos animales en los que la hipertensión no está asociada con diabetes u otros componentes del síndrome metabólico, tales como ratas Sprague-Dawley que reciben Ang II o tratadas con L-NAME, ratas SHR o ratas SHR-SP, los resultados son controvertidos. Así, aunque las tiazolidinedionas previenen el desarrollo de hipertensión (Sarafidis y Nilsson, 2006), en hipertensión establecida no se han descrito cambios en la presión

sanguínea (Diep y cols., 2002b; Llorens y cols., 2007; Nakamura y cols., 2007; Shinzato y cols., 2007; Cipolla y cols., 2010), a menos que se usen tratamientos a largo plazo (Zhang y cols., 2010) o altas dosis de los agonistas PPAR γ (Wu y cols., 2004; Wakino y cols., 2005; Chan y cols., 2010). Apoyando la controversia de efectos ejercidos por los activadores PPAR sobre la presión sanguínea están los resultados encontrados en los distintos polimorfismos del gen PPAR γ . Así, por un lado, una mutación negativa dominante en el gen PPAR γ humano se ha asociado con resistencia a insulina, diabetes e hipertensión severa a una edad temprana (Barroso y cols., 1999). Sin embargo, ratones *knockout* PPAR γ específico de endotelio, no manifestaban un fenotipo hipertensivo aparente a no ser que se indujese hipertensión con una dieta rica en grasas o con alta concentración de sal en la bebida, sugiriendo que PPAR γ endotelial es importante para regular la hipertensión inducida por dieta (Nicol y cols., 2005). Por otro lado, tanto un modelo experimental *knockout* PPAR γ clásico como ratones *knockout* PPAR γ específico de CMLV mostraron un paradójico fenotipo hipotensivo a pesar de presentar una severa resistencia a insulina (Duan y cols., 2007; Chang y cols., 2009). Hay, por tanto, una evidencia genética del papel de los PPAR γ en el control de la homeostasis de la glucosa aunque los resultados sobre presión arterial no son concluyentes.

En el presente estudio nosotros hemos encontrado que ratas SHR de seis meses de edad, con hipertensión claramente establecida, tratadas durante 28 días con 2,5 mg/Kg x día de pioglitazona, dosis que es equivalente a la usada en humanos a quienes se les administra una dosis de 15 mg de pioglitazona (Ishibashi y cols., 2002), mostraron presiones sistólicas similares a las de las ratas no tratadas. Sugiyama y cols. (1990) previamente examinaron el efecto de varias dosis de pioglitazona sobre ratas obesas Wistar, un modelo útil para el estudio de diabetes tipo 2 y obesidad, y encontraron que dosis de 0,3-3 mg/Kg x día de pioglitazona mejoraban significativamente la resistencia a insulina y disminuían los niveles de glucosa y lípidos en sangre, sugiriendo que la dosis de 2,5 mg/Kg x día de pioglitazona usada en este estudio es suficiente para activar el receptor de PPAR γ *in vivo*.

2.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE EL REMODELADO Y RIGIDEZ VASCULAR DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA

Está ampliamente descrito que con la hipertensión se produce remodelado de la pared arterial que conduce a alteraciones en el diámetro del vaso y a cambios en el espesor de la capa media (Touyz, 2005; Mulvany, 2008). No está muy claro si es la presión aumentada *per se* o son otros factores los que inician el proceso de remodelado vascular; sin embargo, el endotelio parece jugar un papel importante ya que sirve como sensor de factores hemodinámicos y humorales y es un moderador de las señales de las CMLV, quienes participan activamente en el proceso de remodelado. Alteraciones en el balance crecimiento/apoptosis, contracción/relajación, producción/degradación de matriz extracelular, migración y diferenciación, así como estimulación de respuestas inflamatorias, dan lugar a un remodelado estructural (Touyz, 2005; Hayashi y Naiki, 2009). De hecho, las alteraciones estructurales de arterias pequeñas se han correlacionado con la reducción de la capacidad vasodilatadora coronaria en sujetos hipertensos (Rizzoni y cols., 2003). En el presente estudio, las AMR de SHR de 6 meses de edad mostraron diámetros interno y externo reducidos, un incremento en la relación media/luz, así como una rigidez vascular aumentada y distensibilidad alterada, lo que está de acuerdo con los resultados encontrados por Briones y cols. (2003) en arterias mesentéricas de esta misma cepa o en arteria cerebral media y arteriolas de ratas hipertensas SHR-SP (Nakamura y cols., 2007). Briones y cols. (2003) sugieren que la alteración en la organización de la elastina junto con el aumento de espesor de la pared de los vasos contribuiría a la alteración de las propiedades estructurales y mecánicas en AMR de SHR.

Además de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, los PPAR γ parecen modular la estructura vascular fundamentalmente en los primeros estadios de la hipertensión. Así, asociado a la prevención del desarrollo de hipertensión, las glitazonas previenen las anormalidades estructurales vasculares (Diep y cols., 2002b; Ledingham y Laverty, 2005). Por su parte, Iglarz y cols. (2003) en arterias mesentéricas de resistencia de ratas DOCA-*salt* observaron que rosiglitazona es capaz de prevenir el remodelado hipertrófico y la disfunción endotelial sin afectar la rigidez vascular, a pesar de que

atenúa parcialmente el desarrollo de hipertensión. En la misma línea están los resultados de Zhang y cols. (2010) quienes han demostrado que tras el tratamiento a largo plazo con altas dosis de pioglitazona hay una reducción de la presión sanguínea y se atenúa el remodelado en aorta de ratas jóvenes y Silva-Junior y cols. (2011) quienes observaron en un modelo de rata con hipertensión inducida por 2 riñones-1 clip que tras el tratamiento con rosiglitazona se reduce el desarrollo de la misma y el remodelado vascular adverso asociado a ésta. Por otra parte, también se han observado correcciones vasculares en ausencia de efectos antihipertensivos en modelos animales en los cuales el tratamiento con las glitazonas comienza antes o al poco tiempo de establecerse la hipertensión. Así, en arterias coronarias y cerebrales de ratas con hipertensión inducida por administración durante 4 o 5 semanas con L-NAME (Ishibashi y cols., 2002; Cipolla y cols., 2010) o en vasos cerebrales y arterias coronarias de ratas jóvenes SHR-SP (Nakamura y cols., 2007; 2008), se ha descrito una reversión del remodelado por glitazonas sin afectar la presión arterial. Por el contrario, Lu y cols. (2010a) observaron que rosiglitazona no modifica las alteraciones estructurales y mecánicas presentes en ratas diabéticas Zucker adultas, a pesar de mejorar la función vascular. El tratamiento con 2,5 mg/kg x día de pioglitazona durante 4 semanas de ratas SHR de 6 meses de edad, que llevan siendo hipertensas un largo período de tiempo, no modificó las alteraciones estructurales y mecánicas observadas. Una posible explicación a estas discrepancias sería el tiempo que los animales llevan siendo hipertensos cuando se inicia el tratamiento, lo que resultaría en variaciones en el remodelado. Además de esto, diferencias en la duración del tratamiento así como en las dosis de glitazonas contribuirían a explicar la diversidad de resultados.

2.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LAS RESPUESTAS VASOCONSTRICTORAS

Aunque la hipertensión se ha asociado generalmente con un incremento de las respuestas vasoconstrictoras a diferentes agonistas (Marín, 1993; Alvarez y cols., 2005), el efecto de dicha patología sobre las respuestas contráctiles va a depender del agente vasoactivo utilizado y del lecho vascular estudiado, así como del modelo experimental de hipertensión. Así, en aorta torácica y arteria carótida de SHR y en arterias femorales

de SHR-SP, se ha descrito incremento de las contracciones inducidas por estimulación adrenérgica debido a una disminución en la liberación del NO endotelial (Dohi y cols., 1996; Dowell y cols., 1999). Por su parte, Zerrouk y cols. (1998) asociaron el incremento en la respuesta contráctil inducida por Ang II al incremento en la liberación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2. También la mayor respuesta contráctil inducida por fenilefrina en aorta de SHR que de WKY se asoció a un incremento en la participación de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 (Alvarez y cols., 2005). Sin embargo, en arterias cerebrales de ratas SHR-SP y SHR las respuestas vasoconstrictoras son menores a las de WKY (Arribas y cols., 1996; Briones y cols., 1999). Asimismo, en ratas con hipertensión inducida por administración crónica de ouabaína la respuesta a fenilefrina es menor en aorta de ratas hipertensas debido a un incremento en la liberación de NO a partir de las isoformas endotelial y neuronal de la NOS (Rossoni y cols., 2002b). En nuestro estudio, la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina fue similar en arterias mesentéricas de resistencia de ratas normotensas e hipertensas, de acuerdo con lo encontrado por Le Marquer-Domagala y Finet (1997) o por Briones y cols. (2000) en este mismo lecho vascular usando L-NAME y noradrenalina, respectivamente.

Se ha descrito que las tiazolidinedionas reducen la contractilidad del músculo liso vascular en respuesta a varios vasoconstrictores, efecto que puede contribuir a la acción antihipertensiva de estos agonistas (Kato y cols., 1999; Satoh y cols., 1999). Así, Buchanan y cols. (1995) proponen que el efecto antihipertensivo de estos agonistas se debe a su capacidad de inhibir directamente las corrientes de calcio en las células del músculo liso. Sin embargo, tras el tratamiento con el agonista PPAR γ pioglitazona también se han sido descrito respuestas incrementadas al agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina en aorta de SHR (Llorens y cols., 2007). En nuestro estudio ni la respuesta a K^+ ni la respuesta a fenilefrina se modificaban después del tratamiento con pioglitazona, resultado que está de acuerdo con lo descrito por Fukuda y cols. (2008) en aorta de ratas tratadas con isoproterenol, y que excluye, aparentemente, un efecto de la glitazona sobre las respuestas vasoconstrictoras.

Está ampliamente descrito que el endotelio modula las respuestas a diferentes vasoconstrictores en distintos lechos vasculares. Así, nuestro grupo ha descrito que la eliminación del endotelio potencia las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina o noradrenalina en arterias mesentéricas de resistencia (Briones y cols., 2000; Xavier y cols., 2004; Wiggers y cols., 2008), aorta (Rossoni y cols., 2002a; Alvarez y cols., 2005) o arteria mesentérica superior de rata (Rossoni y cols., 2002a; Xavier y cols., 2004). En este trabajo también observamos incremento de la respuesta a fenilefrina tras la eliminación del endotelio en AMR de SHR tratadas con pioglitazona.

2.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE DERIVADOS DE COX-2 EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA

Como ya hemos comentado, la mayoría de los efectos antiinflamatorios de los activadores PPAR γ se explican por mecanismos de transrepresión a través de la inhibición de factores de transcripción redox-sensibles implicados en la activación de genes proinflamatorios (Mendez y LaPointe, 2003; Cuzzocrea y cols., 2004; Sánchez-Hidalgo y cols., 2005; Ricote y Glass, 2007). Se ha sugerido que una disminuida expresión de PPAR γ en vasos sanguíneos de SHR puede contribuir a la proliferación, migración, inflamación y fibrosis observada en la hipertensión (Chan y cols., 2010; Li y cols., 2010; Zhang y cols., 2010). Al igual que PPAR γ , PPAR α se expresa en la pared vascular, contribuyendo también a la regulación de la inflamación y la correcta funcionalidad vascular (Staels y cols., 1998; Marx y cols., 2002). En este sentido, Delerive y cols. (1999a) relacionaron las propiedades antiinflamatorias de PPAR α con su capacidad para inhibir la activación de NF- κ B y AP-1, y con ello la expresión de genes proinflamatorios que están bajo su control. En este estudio encontramos que las AMR de SHR muestran menores niveles de ARNm de PPAR γ que las de WKY, mientras que no observamos cambios en la expresión de PPAR α , de forma similar a lo observado por nuestro grupo en segmentos aórticos (Pérez Girón, 2009). Como hemos comentado, otros autores también han encontrado una expresión reducida de PPAR γ en SHR (Wu y cols., 2004; Chan y cols., 2010; Li y cols., 2010; Zhang y cols., 2010). Sin embargo, Diep y Schiffrin (2001) observaron una incrementada expresión tanto de PPAR γ como de PPAR α en arterias mesentéricas de SHR, aunque no en aorta, que explicaron como un

mecanismo compensatorio al crecimiento vascular hipertensivo. Por su parte, Xiong y cols. (2005) observaron niveles reducidos de proteína de PPAR γ en aorta, arterias mesentéricas y CMLV de SHR, a pesar de presentar niveles altos de ARNm. Además, en los últimos años se han descrito alteraciones en la expresión de PPAR γ en los tejidos vasculares durante el desarrollo de hipertensión e incluso variaciones genéticas dentro de la misma especie (Wu y cols., 2004; Xiong y cols., 2005). Así, mientras que a las 5 ó 13 semanas no hay cambios en la expresión de PPAR γ en aorta, arteria mesentérica, caudal o pulmonar de SHR cuando se compara con WKY, a las 21 semanas, cuando la hipertensión de las ratas ya está establecida, sí se encuentra una disminución en la expresión de PPAR γ en SHR (Wu y cols., 2004). Quizá estos hallazgos ayuden a explicar la diversidad de resultados encontrados.

El tratamiento con pioglitazona aumentó significativamente los niveles de PPAR γ en arterias de SHR, de manera similar a lo encontrado por otros autores usando rosiglitazona y pioglitazona en aorta y médula ventrolateral rostral de SHR (Chan y cols., 2010; Zhang y cols., 2010) y al aumento que encontramos también en CMLV en el presente estudio. El Midaoui y cols. (2006) han sugerido que la expresión disminuida de PPAR γ está implicada en el desarrollo de resistencia a insulina e hipertensión arterial en ratas alimentadas crónicamente con glucosa, y que pioglitazona revierte este estado por sus propiedades antioxidantes. Estos resultados estaban de acuerdo con estudios previos que mostraban que el tratamiento con un agonista dual PPAR γ /PPAR α , bezafibrato, reducía el estrés oxidativo y restablecía parcialmente la expresión disminuida de PPAR γ en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Kanie y cols., 2003). Todos estos resultados sugieren que la *upregulación* de PPAR γ quizá contribuya a las propiedades antiinflamatorias de las glitazonas.

La COX-2, enzima clave en la biosíntesis de prostanoïdes, es uno de los genes regulados por factores de transcripción redox-sensibles cuyo aumento se asocia a enfermedades cardiovasculares como la hipertensión. Así, nuestro grupo y otros autores hemos descrito aumentada expresión basal de la proteína o ARNm en otras arterias de animales hipertensos (García-Cohen y cols., 2000; Briones y cols., 2002b; Adeagbo y cols., 2005; Alvarez y cols., 2005; Xavier y cols., 2008; Virdis y cols., 2009). Sin embargo,

el incremento en la expresión vascular de COX-2 se ha descrito no sólo en hipertensión, sino en otras condiciones patológicas asociadas con procesos inflamatorios, tales como artritis, cáncer, aterosclerosis, diabetes o envejecimiento (Félétou y cols., 2011). De acuerdo con esto, en el presente estudio observamos que los niveles de ARNm y de expresión proteica de COX-2 son mayores en AMR de SHR que en ratas normotensas, lo que podría explicarse por la expresión disminuida de PPAR γ , ya que estos receptores reducen la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes proinflamatorios como COX-2. Tras el tratamiento de ratas SHR con pioglitazona, sin embargo, a pesar del aumento en los niveles de PPAR γ en AMR, también observamos un incremento de COX-2, tanto en los niveles de ARNm como en la expresión proteica. Como hemos comentado anteriormente, se han descrito diferentes efectos de los agonistas PPAR γ sobre la expresión de COX-2, observándose tanto un aumento en su expresión (Meade y cols., 1999; Fahmi y cols., 2002; Kalajdzic y cols., 2002; Pontsler y cols., 2002; Bishop-Bailey y Warner, 2003; Kang y cols., 2008) como una reducción (Inoue y cols., 2000; Han y cols., 2003; Mendez y LaPointe, 2003), o incluso ausencia de modulación (Konturek y cols., 2003) en distintos tipos celulares. También se ha descrito una acción dual en la regulación de la expresión de COX-2 por agonistas PPAR γ , de manera que 15d-PGJ₂ aumenta la expresión de COX-2 en ausencia de estímulos inflamatorios mientras que la disminuye en presencia de IL-1 β , TNF- α o LPS (Paik y cols., 2000; Fahmi y cols., 2002). En CMLV de WKY y SHR observamos un efecto dual de pioglitazona similar: aumento de la expresión de COX-2 en ausencia de estímulo inflamatorio, y reducción de esta expresión tras estimulación con IL-1 β .

Es un hecho ampliamente conocido que el tratamiento crónico con agonistas PPAR γ reduce el estado inflamatorio. Así, los agonistas PPAR γ inhiben la expresión de IL-6 y TNF- α en células microgliales expuestas al péptido β -amiloide, células responsables de la activación de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Alzheimer (Combs y cols., 2000), inhiben la producción de IL-4, IL-10 e INF- γ en linfocitos de un modelo animal con encefalomiелitis autoinmune experimental (Diab y cols., 2002), reducen la acumulación de neutrófilos y macrófagos y bloquean la inducción relacionada con isquemia cardiaca de ICAM-1, MCP-1 y L-selectina (Yue y cols., 2001). Además, la activación de PPAR γ en la pared vascular inhibe, entre otros, la producción de

citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión, metaloproteasas y proliferación y migración de CMLV (Touyz y Schiffrin, 2006). Por otra parte, nuestro grupo ha observado que el tratamiento con pioglitazona reduce el incremento de los niveles del ARNm de VCAM-1 en SHR (resultados no mostrados). El hecho de que el tratamiento crónico con pioglitazona reduzca el estado inflamatorio, y posiblemente la activación de las vías de señalización proinflamatorias, y que, como hemos mencionado, los agonistas PPAR regulen la expresión de COX-2 de diferente manera dependiendo de la activación de vías de señalización proinflamatorias, quizá ayude a explicar el incremento de COX-2 observado tras el tratamiento con pioglitazona. Además, este efecto podría estar relacionado con la presencia de un PPRE funcional en la región promotora de COX-2 (Meade y cols., 1999; Bishop-Bailey y Warner, 2003). También en muestras de miocardio de ratas tratadas con pioglitazona está aumentada la expresión y actividad de COX-2, PLA₂ así como los niveles de prostaciclina (Ye y cols., 2006).

El análisis por inmunohistoquímica reveló que, tras del tratamiento con pioglitazona, COX-2 se expresaba en las tres capas vasculares. Además, cuando analizamos COX-2 en fibroblastos y CMLV de aorta de ratas SHR después del tratamiento *in vitro* con pioglitazona, observamos un incremento en la expresión tanto de la proteína como del mensajero de COX-2. También observamos mayor expresión de ARNm de COX-2 en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tras el tratamiento con pioglitazona (resultados no mostrados). Esto está de acuerdo con la presencia de PPAR γ descrita en los diferentes tipos celulares vasculares (Touyz y Schiffrin, 2006; Matsumoto y cols., 2008). Todos estos resultados sugieren que PPAR γ está distribuido de forma ubicua y es activo en la pared vascular donde puede ejercer diferentes papeles en la inflamación.

Los prostanoïdes sintetizados por la COX a partir del AA participan en la regulación del tono vascular, tanto a nivel basal como tras la estimulación con diferentes agonistas (Hernanz y cols., 2003; Alvarez y cols., 2005). Algunos autores han descrito que la expresión incrementada de COX-2 es responsable del incremento en la producción de prostanoïdes contráctiles y su participación en respuestas vasoconstictoras así como de la disfunción endotelial descrita en animales hipertensos o en el envejecimiento

(Alvarez y cols., 2005; Féléto y cols., 2011). Así, en arterias de animales hipertensos se ha descrito un incremento en la participación de prostanoídes contráctiles en las respuestas vasoconstrictoras producidas por agentes vasoactivos como ET-1 (Taddei y Vanhoutte, 1993), Ang II (Zerrouk y cols., 1998), noradrenalina (Dantas y cols., 1999; Adeagbo y cols., 2005) o fenilefrina (Alvarez y cols., 2005). Para determinar la participación de prostanoídes derivados de COX-2 en la respuesta inducida por fenilefrina, las AMR se incubaron con el inhibidor selectivo de esta enzima, NS 398, el cual no modificó la respuesta a fenilefrina ni en WKY ni en SHR. Sin embargo, en SHR tratadas con pioglitazona NS 398 redujo la contracción inducida por fenilefrina, sugiriendo que el incremento de COX-2 observado tras el tratamiento tiene una consecuencia funcional aumentando la participación de prostanoídes contráctiles en la respuesta a fenilefrina. En línea con nuestros resultados, otros autores han observado una mayor participación de prostanoídes contráctiles derivados de COX-2 en anillos aórticos tras el tratamiento con glitazonas (Fujiwara y cols., 1998; Llorens y cols., 2007).

Una vez determinado el incremento de la participación de prostanoídes contráctiles en la respuesta a fenilefrina tras el tratamiento con pioglitazona, quisimos conocer la naturaleza de los mismos. La PGE₂ puede actuar como prostanoide vasoconstrictor a través de la activación de sus receptores específicos EP₁ y EP₃ (Wright y cols., 2001). Para determinar si este prostanoide estaba implicado en la contracción inducida por fenilefrina, las arterias se incubaron con SC 19220, antagonista del receptor EP₁/EP₃. Este fármaco no modificó la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en AMR de ratas tratadas con pioglitazona excluyendo, por tanto, la participación de la PGE₂ en el efecto vasoconstrictor de fenilefrina. Gluais y cols. (2005; 2006) en aorta de SHR también descartaron la implicación de esta prostaglandina en la contracción a acetilcolina. Sin embargo, se han descrito resultados contrarios donde PGE₂, vía activación del receptor EP₁, actúa como factor contráctil derivado de endotelio en arteria femoral de ratas diabéticas (Shi y cols., 2007). Otros prostanoídes producen vasoconstricción actuando sobre el receptor TP. El antagonista del receptor TP SQ 29,548 redujo la contracción a fenilefrina en AMR de ratas tratadas con pioglitazona, confirmando la participación de prostanoídes actuando sobre el receptor TP en estas arterias.

Para analizar si los derivados de COX-2 que participan en la respuesta a fenilefrina en AMR de ratas tratadas con pioglitazona proceden del endotelio, realizamos experimentos retirando esta capa vascular. En esta situación experimental, NS 398 inhibió ligeramente la contracción a fenilefrina, aunque este efecto fue mucho menor al observado en arterias con el endotelio intacto. Por otra parte, en segmentos de AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona desnudos de endotelio, observamos que desaparecía el efecto del antagonista del receptor TP SQ 29,548 sobre la respuesta contráctil a fenilefrina. Estos resultados sugieren que los prostanoideos derivados de COX-2 implicados en las respuestas a fenilefrina mediante unión a receptor TP son fundamentalmente de origen endotelial.

Aunque se ha descrito la participación del TXA₂ en las respuestas vasoactivas en distintos lechos vasculares como arteria carótida (Zhou y cols., 1999) o aorta (Lin y Nasjletti, 1991; Taddei y Vanhoutte, 1993; Gluais y cols., 2006) de ratas hipertensas y vasos de resistencia de WKY y SHR tras el tratamiento crónico con aldosterona (Xavier y cols., 2008), la falta de efecto del inhibidor de la sintasa TXA₂ furegrelato sobre la respuesta a fenilefrina en animales tratados con pioglitazona, sugiere que otros prostanoideos distintos al TXA₂, actuando sobre el receptor TP, contribuyen a la contracción inducida por fenilefrina. Resultados similares obtuvieron Viridis y cols. (2009), quienes excluyeron la participación del TXA₂ como prostanoide contráctil derivado de COX en AMR de ratas SHR, o Blanco-Rivero y cols. (2005) quienes descartaron que TXA₂ fuese responsable de la reducción de las relajaciones endotelio-dependientes a acetilcolina en segmentos aórticos de ratas tratadas con aldosterona. También Yang y cols. (2002) y Gluais y cols. (2005) descartaron al TXA₂ como factor contráctil derivado de endotelio liberado tras activación del receptor muscarínico en aorta de ratas hipertensas.

Además del TXA₂, otros derivados de COX-2 tales como PGF_{2α} e isoprostanos pueden mediar vasoconstricción a través de unión al receptor TP (Féléto y cols., 2009), por lo que estos mediadores podrían estar implicados en la respuesta a fenilefrina. En este sentido, se ha implicado a PGF_{2α} en la respuesta vasoconstrictora inducida por Ang II en aorta de ratas con hipertensión inducida por coartación de la aorta (Lin y Nasjletti,

1991), en aorta de ratas SHR (Alvarez y cols., 2005) o en el lecho mesentérico de ratas ovariectomizadas tras la estimulación con noradrenalina (Dantas y cols., 1999). Aunque los isoprostanos se producen fundamentalmente por modificación oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados por un mecanismo no enzimático catalizado por radicales libres (Morrow y Roberts, 1997), algunos estudios han descrito que pueden ser un producto directo de COX o una consecuencia indirecta de la producción de aniones superóxidos por el metabolismo mediado por COX. Así, Tomida y cols. (2003) observaron un incremento de los niveles urinarios de 8-isoprostano, que fue abolido por NS 398, en ratas con hipertensión inducida por L-NAME. Viridis y cols. (2009) observaron un aumento en los niveles de 8-isoprostano derivado de COX-2 tras la curva concentración-respuesta a acetilcolina en vasos mesentéricos de SHR, que se asoció con la disfunción endotelial encontrada en este modelo crónico de hipertensión. Por su parte, Delannoy y cols. (2010) asociaron la producción de 8-isoprostano dependiente de COX-2 a la hiperreactividad inducida por hipoxia en arterias pulmonares. Debido a que no disponemos de herramientas farmacológicas para analizar la participación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano en la contracción a fenilefrina, medimos los niveles de dichos compuestos en el medio de incubación de las arterias, una vez finalizada la curva concentración-respuesta a fenilefrina. En nuestro modelo experimental los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 8-isoprostano fueron similares en muestras de SHR y WKY. Similares resultados fueron descritos por Gluais y cols. (2005) quienes observaron que estos prostanoides tampoco participaban en la contracción inducida por acetilcolina en aorta de SHR. El tratamiento con pioglitazona no modificó estos niveles, descartando la implicación de estos compuestos en el efecto de pioglitazona sobre la respuesta a fenilefrina. Sin embargo, Bagi y cols. (2004) describieron que rosiglitazona mejoraba la dilatación arteriolar coronaria en ratones diabéticos por disminuir la producción de 8-isoprostano así como de anión superóxido derivado de la NAD(P)H oxidasa y Potenza y cols. (2009) observaron que tras el tratamiento con rosiglitazona los niveles de 8-isoprostano y p22phox disminuían en aorta de ratas SHR, mejorando el fenotipo cardiovascular de esta cepa hipertensa.

Otro derivado de COX-2, la PGH_2 también puede mediar vasoconstricción a través de unión al receptor TP, aunque esa contracción es transitoria debido a que su vida media

es muy corta en solución acuosa (Dickinson y Murphy, 2002), por ser una prostaglandina inestable que se transforma espontánea o enzimáticamente en un isómero más estable (Ge y cols., 1995). Por lo tanto, los niveles de PGH_2 son difíciles de medir y aún se necesitan estudios en mayor profundidad para conocer con precisión su contribución en las respuestas vasculares (Félétou y cols., 2009).

La prostaciclina es el principal prostanoide vasodilatador generado por la vía de la ciclooxigenasa en las células endoteliales, que actúa sobre receptores IP. Sin embargo, durante los últimos años crecientes evidencias han señalado a la prostaciclina como un factor vasoconstrictor derivado de endotelio capaz de activar receptores TP en diferentes condiciones tales como hipertensión o envejecimiento (Blanco-Rivero y cols., 2005; Gomez y cols., 2008; Xavier y cols., 2008; Félétou y cols., 2009). La administración del análogo de la prostaciclina iloprost a arterias precontraídas con fenilefrina dio lugar a una respuesta bifásica consistente en una rápida contracción seguida de una lenta relajación; la fase contráctil fue mayor en SHR que en WKY, de forma similar a lo descrito por otros autores usando PGI_2 y/o iloprost (Gluais y cols., 2005; Gomez y cols., 2008; Xavier y cols., 2008), mientras que la relajación inducida por iloprost fue más lenta en SHR que en WKY. Por su parte, Gomez y cols. (2008) describieron que la aorta de WKY relaja más a prostaciclina y beraprost, otro análogo de la PGI_2 , que SHR. El tratamiento de SHR con pioglitazona no modificó ninguna de las dos fases.

Se ha descrito que PGI_2 además de unirse a los receptores IP y TP puede ejercer sus efectos a través de los receptores EP_1/EP_3 (Narumiya y cols., 1999). Así, McCormick y cols. (2010) demostraron que análogos de la prostaciclina activan receptores EP en arteria ilíaca de conejo y Xavier y cols. (2009) observaron en AMR de ratas Sprague-Dawley que la contracción a PGI_2 se prevenía cuanto se bloqueaban los receptores TP y EP. En el presente trabajo observamos que la vasoconstricción a iloprost en ratas tratadas con pioglitazona es reducida por el antagonista del receptor TP pero no por los antagonistas de los receptores IP y EP_1/EP_3 , lo que confirma la participación del receptor TP en la contracción inducida por el análogo de la PGI_2 . Como era de esperar, la relajación a iloprost fue casi completamente abolida por el antagonista del receptor IP RO 1138452, confirmando que el efecto relajante de esta sustancia implica la

estimulación de receptores IP, como ya han observado Gomez y cols. (2008) o Xavier y cols. (2009) utilizando prostaciclina. El antagonista del receptor EP₁/EP₃ SC 19220 no modificó la fase relajadora a iloprost, mientras que ésta fue acelerada por el antagonista del receptor TP SQ 29,548, lo que está de acuerdo con los resultados descritos por Gomez y cols. (2008) en aorta de rata usando prostaciclina y su análogo beraprost, que sugieren que la activación de receptores TP, incluso por un agonista débil y parcial de estos receptores tales como prostaciclina, puede bloquear marcadamente la relajación vascular.

Aunque la prostaciclina tiene menor afinidad por los receptores TP que otros productos derivados de COX-2 (Cheng y cols., 2002; Gluais y cols., 2005), el hecho de que en el endotelio la prostaciclina sea el prostanoide mayoritario liberado por COX-2 (Cheng y cols., 2002; Blanco-Rivero y cols., 2005), sugiere que este mediador puede ser importante en las respuestas vasculares asociadas a los niveles incrementados de COX-2. En este trabajo hemos observado que los niveles de prostaciclina tras la estimulación con fenilefrina eran menores en muestras de animales hipertensos que normotensos, de acuerdo a lo descrito por otros autores en AMR de WKY y SHR (Soma y cols., 1985; Matrougui y cols., 1997). En este modelo experimental también se han descrito niveles incrementados de este prostanoide en aorta tras estimular con fenilefrina (Alvarez y cols., 2005) o acetilcolina (Gluais y cols., 2005) y en AMR estimuladas con acetilcolina (Virdis y cols., 2009), así como niveles similares en aorta en condiciones basales (Gluais y cols., 2005) y en AMR estimuladas con acetilcolina (Xavier y cols., 2008). El tratamiento con pioglitazona incrementó los niveles de prostaciclina, de forma similar a lo encontrado por Ye y cols. (2006) en muestras miocárdicas, donde estos autores establecieron una relación entre el aumento en dichos niveles y el efecto protector de pioglitazona observado en el daño por reperfusión miocárdica. También Peredo y cols. (2008) observaron que el tratamiento con pioglitazona restablecía la liberación disminuida de prostaciclina en aorta y lecho vascular mesentérico de ratas tratadas con fructosa. Además, el inhibidor de la síntesis de prostaciclina tranilcipromina redujo la respuesta inducida por fenilefrina sólo en AMR de ratas tratadas con pioglitazona, mientras que el antagonista del receptor IP RO 1138452 no modificó las contracciones inducidas por fenilefrina. Estos resultados junto con los efectos similares de SQ 29,548

sólo y en combinación con RO 1138452, nos permite concluir que la liberación de PGI₂, sintetizada fundamentalmente en el endotelio por COX-2 y actuando sobre receptores TP, participa en la respuesta vasoconstrictora inducida por fenilefrina en AMR de ratas SHR tratadas con pioglitazona.

A pesar de que actúe como vasoconstrictor, el incremento de los niveles de PGI₂ podría tener efectos cardiovasculares beneficiosos debido a que este prostanoide posee efectos antiaterogénicos y antitrombóticos y causa inhibición de la agregación plaquetaria y leucocitaria (Vane, 2002; Mitchell y cols., 2008). De hecho, la inhibición a largo plazo de la COX-2 por compuestos de la familia de los coxibs puede causar un aumento en la incidencia de infarto de miocardio y derrame cerebral, debido posiblemente a la supresión del papel ateroprotector de COX-2 en células endoteliales (Bombardier y cols., 2000). Por su parte, Bolego y cols. (2006) observaron en HUVEC obtenidas de pacientes diabéticos una menor expresión de COX-2 que se correlacionaba con menores niveles de PGI₂ y, por lo tanto, con un incremento en las complicaciones cardiovasculares asociadas a la patología diabética.

2.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA

Está ampliamente descrito que la producción incrementada de ROS juega un importante papel en situaciones fisiopatológicas como la hipertensión, en la que se ha observado tanto un incremento en el estrés oxidativo (Zalba y cols., 2000; Touyz y Schiffrin, 2004; Lee y Griendling, 2008; Harrison y Gongora, 2009), como una mayor participación de las ROS en las respuestas vasoconstrictoras (Alvarez y cols., 2008; García-Redondo y cols., 2009b; Viridis y cols., 2009). Una de las especies reactivas de oxígeno implicadas en la disfunción vascular parece ser el O₂⁻, que potencia las contracciones dependientes de endotelio y produce un deterioro de las respuestas vasodilatadoras por su capacidad de inactivar al principal factor relajante vascular, el NO (Yang y cols., 2002; Viridis y cols., 2009). Sin embargo, también se han descrito efectos vasodilatadores inducidos por O₂⁻ (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995) y ausencia de modulación de las respuestas contráctiles por O₂⁻ (Girouard y Champlain,

2004). Evidencias obtenidas en animales de experimentación y estudios llevados a cabo en humanos sugieren que la NAD(P)H oxidasa es la enzima principal productora de $O_2^{\cdot -}$ a nivel vascular. En distintos modelos de hipertensión, las subunidades NOX-1, NOX-2, NOX-4, rac-1 y/o p22phox están aumentadas (Nakamura y cols., 2008; Briones y cols., 2011). Además, se ha descrito que la reducción en la actividad de los sistemas antioxidantes celulares también contribuye al incremento en el estrés oxidativo (Redón y cols., 2003; Chaves y cols., 2007; Chan y cols., 2009).

Nuestros resultados están de acuerdo con esta hipótesis ya que comparado con WKY, en arterias de SHR se observó un mayor efecto inhibitorio de alopurinol y apocinina, inhibidores respectivos de la xantina oxidasa y NAD(P)H oxidasa, sobre la respuesta contráctil a fenilefrina, lo que indica la participación de $O_2^{\cdot -}$ en dicha respuesta. Apoyando lo anteriormente dicho están los resultados en los que inhibidores de la NAD(P)H oxidasa disminuyen las contracciones en un modelo de hipertensión inducido por Ang II (Püntmann y cols., 2005), así como el tono espontáneo en aorta de ratas hipertensas DOCA-*salt* (Ghosh y cols., 2004). Además, las arterias de SHR presentaban un incremento en los niveles del ARNm de NOX-1, una mayor producción de $O_2^{\cdot -}$ así como mayores niveles plasmáticos de MDA, ya descrito por nuestro grupo y otros investigadores (Alvarez y cols., 2007; Viridis y cols., 2009). Por otra parte, aunque los niveles de catalasa no se modificaron, la expresión reducida de Cu/Zn-, Mn- y EC-SOD podría contribuir a explicar el aumento de estrés oxidativo observado en la cepa hipertensa. De acuerdo con nuestros resultados, Nozoe y cols. (2007) encontraron que la expresión de la Cu/Zn-SOD en el núcleo del tracto solitario era menor en ratas SHR-SP que en sus controles normotensos. Por su parte, Wu y cols. (2001) encontraron mayores niveles de $O_2^{\cdot -}$ derivados de una mayor actividad de la NAD(P)H oxidasa tanto en el modelo de hipertensión de ratas DOCA-*salt* como en ratas SHR; sin embargo, sólo en aortas procedentes de ratas DOCA-*salt* existía una relación clara entre el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ y la reducción en la expresión de Cu/Zn-SOD, sugiriendo que el impacto de la alteración en los mecanismos detoxificantes sobre el estrés oxidativo es dependiente también del modelo de hipertensión en estudio.

Gran parte de los efectos antiinflamatorios, así como los efectos pleiotrópicos beneficiosos en enfermedades cardiovasculares que tienen los agonistas PPAR γ se han asociado a su capacidad de reducir el estrés oxidativo. Así, la disminución en el estrés oxidativo protege del daño cerebrovascular inducido por hipertensión (Nakamura y cols., 2007), previene la hipertensión en ratas SHR (Chan y cols., 2010) o contribuye a la mejora de la función endotelial (Nakamura y cols., 2008; Matsumoto y cols., 2008). Se ha descrito que las glitazonas reducen el estrés oxidativo por inhibir la expresión de los diferentes componentes de la NAD(P)H oxidasa y la subsecuente producción de ROS (Inoue y cols., 2001; Iglarz y cols., 2003; Dobrian y cols., 2004; Bagi y cols., 2004; Hwang y cols., 2007; Nakamura y cols., 2007; 2008; Potenza y cols., 2009) y/o incrementar las defensas antioxidantes, como las SODs (Inoue y cols., 2001; Villegas y cols., 2004; Hwang y cols., 2005; Potenza y cols., 2009). Así, rosiglitazona mejora la respuesta vasodilatadora en ratas obesas Zucker probablemente por disminuir la actividad de la NAD(P)H oxidasa y, por tanto, los niveles de anión superóxido (Xiang y cols., 2008). Similares resultados obtuvieron Nakamura y cols. (2008) en aorta de ratas SHR-SP, quienes asociaron la mejoría de la función endotelial con la capacidad de la pioglitazona de disminuir la producción de ROS, posiblemente por interferir con la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa. De acuerdo con esto, en el presente trabajo el tratamiento de ratas SHR con pioglitazona también mostró propiedades antioxidantes ya que redujo los niveles de ARNm de NOX-1 así como de NOX-2 y p47phox (datos no mostrados) en AMR y normalizó la producción incrementada de O₂⁻. Además, abolió el efecto inhibitorio de alopurinol y apocinina sobre la contracción inducida por fenilefrina. Hwang y cols. (2007) observaron que el tratamiento con rosiglitazona reduce la expresión de NOX-1, NOX-2 y NOX-4 en aorta de ratones diabéticos de forma paralela a la reducción de la producción de O₂⁻. Por otra parte, después del tratamiento con pioglitazona se observó reducción de la expresión de EC-SOD, sin verse afectadas la expresión de Cu/Zn- y Mn-SOD. Nakamura y cols. (2008) tampoco vieron modificaciones en la expresión de la isoforma Cu/Zn-SOD en aorta de ratas SHR-SP tras el tratamiento con pioglitazona, ni Hwang y cols. (2007) en tejido aórtico de ratones diabéticos tras el tratamiento con rosiglitazona. Sin embargo, en HUVEC se ha observado que la activación de PPAR γ potencia la expresión y/o actividad del enzima (Inoue y cols., 2001; Hwang y cols., 2005). Similares resultados han obtenido Yu y cols.

(2008) quienes observaron que rosiglitazona ejercía un efecto neuroprotector en ratas epilépticas por suprimir la producción de ROS y potenciar la actividad antioxidante de las SODs. Por su parte, Matsumoto y cols. (2007) observaron que pioglitazona mejoraba la relajación dependiente de endotelio en aorta por reducir el estrés oxidativo mediante el incremento de la actividad SOD, además de la disminución de la actividad NAD(P)H oxidasa, en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. Por el contrario, los niveles del ARNm de catalasa se incrementaron tras el tratamiento con pioglitazona, lo que está de acuerdo con lo observado por Bagi y cols. (2004). La existencia de un PPRE en la región promotora del gen de la catalasa (Girnun y cols., 2002) podría explicar este efecto y contribuiría a la reducción del estrés oxidativo por los agonistas PPAR γ .

2.6. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA VASCULAR A FENILEFRINA

Como se ha comentado previamente, el NO liberado por el endotelio ejerce múltiples funciones cardioprotectoras. Así, en plaquetas inhibe la adhesión y agregación plaquetaria y en músculo liso vascular induce vasodilatación e inhibición del remodelado vascular y proliferación celular (Moncada y Higgs, 2006). Por otra parte, ha sido ampliamente descrito que la hipertensión se caracteriza por presentar disfunción endotelial (Félétou y Vanhoutte, 2006). Entre los mecanismos que pueden individualmente o en asociación explicar la disfunción endotelial en esta patología cabe destacar: 1) disminución en la producción de NO (Chou, 1998; Dowell y cols., 1999) o aumento en su degradación (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997); 2) incremento en la liberación de ET-1 (Félétou y Vanhoutte, 2006); 3) alteraciones en el transporte del precursor del NO L-arginina (Schlaich y cols., 2004) o en la vía de la GC-GMPc (Courtois y cols., 2003); 4) liberación de un factor contráctil derivado de endotelio que contrarresta los efectos vasodilatadores del NO (Félétou y cols., 2009); 5) incremento en la producción y/o participación de vasoconstrictores derivados del ácido araquidónico (Alvarez de Sotomayor y cols., 2007). Sin embargo, a pesar de lo anteriormente mencionado, los mecanismos más aceptados actualmente para explicar la disfunción endotelial tanto en la hipertensión arterial humana como en la

experimental se asocian a la disminución de la biodisponibilidad de NO, bien por un incremento en su metabolismo por O_2^- , cuyos niveles como hemos comentado están aumentados con la hipertensión (Rajagopalan y cols., 1996; Hamilton y cols., 2001), y/o por un enmascaramiento de sus efectos al incrementarse la producción de prostanoïdes contráctiles (Dohi y cols., 1996; Zhou y cols., 1999). En nuestras condiciones experimentales, donde hemos visto una mayor producción de O_2^- en ratas hipertensas que normotensas, la administración de acetilcolina a segmentos precontraídos con fenilefrina, originó una respuesta vasodilatadora que fue ligeramente menor en AMR de SHR. Este deterioro en la relajación también ha sido ampliamente descrito por otros autores tanto en arterias de conductancia (Rapoport y Williams, 1996; Zhou y cols., 1999; Alvarez y cols., 2005) como de resistencia (Tschudi y cols., 1996; Briones y cols., 2000), aunque también se han descrito relajaciones dependientes de endotelio no alteradas (Hutri-Kähönen y cols., 1999; Briones y cols., 2002a) e incluso aumentadas (Dowell y cols., 1999; Hernanz y cols., 2008) con la hipertensión. En diversos lechos vasculares se ha descrito que el NO, además de su efecto vasodilatador, puede modular respuestas vasoconstrictoras a diferentes agentes tanto en modelos animales normotensos (O'Brien y cols., 2001; Alvarez y cols., 2008) como hipertensos (Briones y cols., 2000; Rossoni y cols., 2002b). Tras la inhibición de NO con un inhibidor no selectivo de la NOS, L-NAME, observamos un desplazamiento hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta inducida por fenilefrina que fue mayor en animales normotensos que hipertensos. Estos resultados nuevamente confirman que la biodisponibilidad del NO está reducida en animales hipertensos.

Aunque hay un gran número de estudios analizando los efectos que ejercen las glitazonas sobre la contractilidad del músculo liso, los efectos de las tiazolidinedionas sobre la generación de NO no están claros. Así, mientras algunos autores han encontrado liberación incrementada de NO y/o de la actividad NO sintasa por glitazonas (Calnek y cols., 2003; Dobrian y cols., 2004; Wakino y cols., 2005; Llorens y cols., 2007), otros no observan efectos de las glitazonas sobre la señal mediada por NO (Ryan y cols., 2004; Ye y cols., 2006; Li y cols., 2010). Nosotros encontramos que la vasodilatación inducida por acetilcolina en AMR era restablecida tras el tratamiento de SHR con pioglitazona, de forma similar a lo descrito en otros modelos de hipertensión

(Diep y cols., 2002b; Ryan y cols., 2004; Nakamura y cols., 2007) así como en ratas diabéticas Zucker (Walker y cols., 1999). Además, el efecto potenciador de L-NAME sobre la contracción a fenilefrina aumenta tras el tratamiento de SHR con pioglitazona, de forma similar a lo encontrado por Llorens y cols. (2007) en aorta de ratas SHR, sugiriendo que pioglitazona aumenta la liberación y/o disponibilidad de NO derivado de endotelio en un intento de modular las contracciones a fenilefrina.

Los mecanismos que subyacen a la mejora en las relajaciones dependientes de endotelio por las glitazonas no son del todo comprendidos; sin embargo, dichos beneficios parecen ser atribuidos, al menos en parte, a los efectos directos sobre las células vasculares, tales como el aumento en la producción o biodisponibilidad de NO, la reducción de la producción endógena de ET-1, así como por la disminución del estrés oxidativo por la regulación de la expresión y/o actividad de las enzimas productoras de ROS o de las defensas antioxidantes celulares (Nakamura y cols., 2007; 2008; Matsumoto y cols., 2008). Sin embargo, un reciente estudio ha demostrado que eNOS y la vía de señalización mediada por PI3 quinasa/Akt/eNOS, tras estimular con insulina, no se modifica por el tratamiento con rosiglitazona en segmentos aórticos de SHR adultas (Li y cols., 2010). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que ROS está implicado en las alteraciones vasculares en ratas SHR y que pioglitazona reduce estas ROS, lo que incrementaría la biodisponibilidad de NO contribuyendo a su efecto cardioprotector, como ha sido descrito por Bagi y cols. (2004) en arteriolas coronarias de ratones con diabetes tipo 2. Por otra parte, el aumento en la respuesta a acetilcolina así como la mayor participación de NO en la respuesta a fenilefrina no era debida al aumento en la expresión de eNOS, ya que no se vio modificada tras el tratamiento con pioglitazona. Estos resultados son similares a los obtenidos por Calnek y cols. (2003), quienes han demostrado liberación incrementada de NO por células endoteliales a través de mecanismos transcripcionales no relacionados con la expresión de eNOS, y con los de Wakino y cols. (2005) quienes observaron un aumento de NO renal tras el tratamiento de ratas SHR con pioglitazona sin modificación en ninguna de las isoformas de las NOS. Tampoco Nakamura y cols. (2007; 2008) vieron cambios en la actividad de la eNOS tras el tratamiento con pioglitazona a pesar de la mejoría en la disfunción endotelial. Por su parte, Ryan y cols. (2004) observaron que la mejora de la respuesta a

acetilcolina y NO en arterias carótidas de ratas diabéticas Zucker tratadas con rosiglitazona, no implicaba cambios en la señal mediada por NO ya que ni eNOS ni la GCs se veían alteradas. Sin embargo, en aortas femorales de ratas diabéticas Zucker, Lu y cols. (2010a) ven que, tras el tratamiento con rosiglitazona, se restablece la disminuida expresión de eNOS, lo que se relaciona con una mejora de la disfunción endotelial encontrada en este modelo experimental.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, el tratamiento con pioglitazona, aunque no tuvo efectos sobre la presión arterial, modificó la participación de diferentes mediadores en la respuesta a fenilefrina en arterias de resistencia de ratas SHR. Así, se observó una producción incrementada de prostaciclina, probablemente por aumento de COX-2. Aunque en nuestras condiciones experimentales PGI₂ parece actuar como vasoconstrictor, los niveles incrementados de este prostanoide serían beneficiosos porque ejerce un papel cardioprotector importante a través de la inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria y por sus efectos pleiotrópicos sobre el músculo liso vascular, como ha sido propuesto para explicar los efectos adversos que ejercen los inhibidores selectivos de COX-2, aunque son necesarias más investigaciones para clarificar este punto. Además, la reducción del estrés oxidativo, que puede incrementar la biodisponibilidad del NO, también contribuiría al efecto protector de las glitazonas ampliamente descrito en varias patologías cardiovasculares.

CONCLUSIONES

1. El aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ debido al aumento de la expresión y actividad de la NAD(P)H oxidasa contribuye a la inducción de COX-2 por la citoquina proinflamatoria IL-1 β en CMLV de animales normotensos e hipertensos. El incremento de los niveles de H_2O_2 , encontrado exclusivamente en CMLV de SHR, puede explicar la mayor inducción de la expresión de COX-2 observada en esta cepa.
2. La activación del factor de transcripción NF- κ B, como consecuencia del aumento del estrés oxidativo producido por IL-1 β , está implicada en la inducción de la expresión de COX-2 en CMLV de SHR.
3. La activación de PPAR γ reduce la expresión de COX-2 inducida por IL-1 β en CMLV por la inhibición de la expresión y actividad de la NAD(P)H oxidasa, la disminución de los niveles de ROS y la consiguiente reducción de la activación del factor de transcripción NF- κ B.
4. El tratamiento de ratas hipertensas con el activador PPAR γ pioglitazona no modifica la respuesta a fenilefrina ni mejora las alteraciones estructurales y mecánicas observadas en arterias de resistencia, lo que puede ayudar a explicar la falta de efecto antihipertensivo de este tratamiento.
5. El incremento en la expresión vascular de COX-2 origina un aumento en la producción endotelial de prostaciclina y su participación en la respuesta a fenilefrina, actuando como vasoconstrictor a través de la activación de receptores TP.
6. El tratamiento con pioglitazona reduce el estrés oxidativo vascular, aboliendo su participación en la respuesta a fenilefrina, por reducir la expresión de NOX-1, y probablemente la actividad de la NAD(P)H oxidasa, así como por aumentar los niveles de la enzima detoxificante catalasa. La reducción de la producción de ROS a nivel vascular puede incrementar la biodisponibilidad de NO, aumentando su participación en la respuesta a fenilefrina y ayudando a explicar la mejora de la disfunción endotelial observada tras el tratamiento.

7. Todos estos efectos están favorecidos por el aumento inducido con pioglitazona en los niveles vasculares de PPAR γ , los cuales se encuentran reducidos en SHR.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados de este trabajo aportan nuevos datos sobre las alteraciones que se observan con la hipertensión, los mecanismos implicados en las mismas y su modulación por agonistas PPAR γ . La reducción del estrés oxidativo, que puede incrementar la biodisponibilidad del NO, así como el efecto sobre la expresión de COX-2 puede también contribuir a las acciones protectoras de las glitazonas ampliamente descritas en varias patologías cardiovasculares. Aunque en nuestras condiciones experimentales PGI₂ actúa como vasoconstrictor, niveles incrementados de este prostanoides serían beneficiosos puesto que ejerce un papel cardioprotector importante a través de la inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria y por sus efectos pleiotrópicos sobre el músculo liso vascular. Estudios adicionales son necesarios para evaluar las potenciales implicaciones de dichos agonistas en pacientes hipertensos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Latif AA (2001) Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(3):153-63
- Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA (2005) Cyclooxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens* 23(5):1025-36
- Akata T (2007) Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth* 21(2):232-42
- Akpononu BE, Mulrow PJ, Hoffman EA (1996) Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis Mon* 42(10):609-722
- Alvarez de Sotomayor M, Bueno R, Pérez-Guerrero C, Herrera MD (2007) Effect of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on endothelial function of small mesenteric arteries from SHR. *J Vasc Res* 44(5):354-64
- Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M (2005) Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* 23(4):767-77
- Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M (2008) Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 153(5):926-35
- Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M (2007) Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321(1):381-8
- Ameshima S, Golpon H, Cool CD, Chan D, Vandivier RW, Gardai SJ, Wick M, Nemenoff RA, Geraci MW, Voelkel NF (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. *Circ Res* 92(10):1162-9
- Andresen J, Shafi NI, Bryan RM Jr (2006) Endothelial influences on cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 100(1):318-27
- Andrew PJ, Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3):521-31
- Antman EM, DeMets D, Loscalzo J (2005) Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 112(5):759-70
- Arribas SM, Gordon JF, Daly CJ, Dominiczak AF, McGrath JC (1996) Confocal microscopic characterization of a lesion in a cerebral vessel of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Stroke* 27(6):1118-22

- Arribas SM, Hillier C, González C, McGrory S, Dominiczak AF, McGrath JC (1997) Cellular aspects of vascular remodeling in hypertension revealed by confocal microscopy. *Hypertension* 30(6):1455-64
- Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM (1989) Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13(6 Pt 2):859-64
- Bachschnid M, Thureau S, Zou MH, Ullrich V (2003) Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *FASEB J* 17(8):914-6
- Bagi Z, Koller A, Kaley G (2004) PPARgamma activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(2):H742-8
- Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M (1995) Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol* 269(6 Pt 1):L829-36
- Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S (1999) Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402(6764):880-3
- Batlouni M (2010) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. *Arq Bras Cardiol* 94(4):556-63
- Baumbach GL, Heistad DD (1989) Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13(6 Pt 2):968-72
- Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK (2004) Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med* 37(9):1384-92
- Bellien J, Thuillez C, Joannides R (2008) Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundam Clin Pharmacol* 22(4):363-77
- Beltrán AE, Briones AM, García-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M (2009) p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertension* 27(1):142-54
- Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G, Biswas C, Cullinan CA, Hayes NS, Li Y, Tanen M, Ventre J, Wu MS, Berger GD, Mosley R, Marquis R, Santini C, Sahoo SP, Tolman RL, Smith RG, Moller DE (1999) Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem* 274(10):6718-25
- Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPAR. *Annu Rev Med* 53:409-35

- Berger J, Wagner JA (2002) Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes Technol Ther* 4(2):163-74
- Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC (2001a) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38(5):1107-11
- Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC (2001b) Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension* 37(2 Part 2):781-6
- Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA (1998) Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(10):1655-61
- Bishop-Bailey D, Warner TD (2003) PPARgamma ligands induce prostaglandin production in vascular smooth muscle cells: indomethacin acts as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. *FASEB J* 17(13):1925-7
- Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G (2005) Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 46(1):107-12
- Blanco-Rivero J, Márquez-Rodas I, Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, Ferrer M, Balfagón G (2007) Long-term fenofibrate treatment impairs endothelium-dependent dilation to acetylcholine by altering the cyclooxygenase pathway. *Cardiovasc Res* 75(2):398-407
- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5):267-73
- Böhm F, Pernow J (2007) The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 76(1):8-18
- Bolego C, Buccellati C, Radaelli T, Cetin I, Puglisi L, Folco G, Sala A (2006) eNOS, COX-2, and prostacyclin production are impaired in endothelial cells from diabetics. *Biochem Biophys Res Commun* 339(1):188-90
- Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ; VIGOR Study Group (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343(21):1520-8
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM (1998) Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 83(12):1271-8
- Bowie A, O'Neill LA (2000) Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 59(1):13-23

- Brakemeier S, Eichler I, Knorr A, Fassheber T, Köhler R, Hoyer J (2003) Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species. *Kidney Int* 64(1):199-207
- Bren-Mattison Y, Meyer AM, Van Putten V, Li H, Kuhn K, Stearman R, Weiser-Evans M, Winn RA, Heasley LE, Nemenoff RA (2008) Antitumorigenic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in non-small-cell lung cancer cells are mediated by suppression of cyclooxygenase-2 via inhibition of nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* 73(3):709-17
- Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salaices M (2002a) Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 39(3):378-88
- Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Tovar S, Vila E, Salaices M (2002b) Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. *Life Sci* 71(17):1997-2014
- Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagón G, Salaices M (2000) Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 131(2):185-94
- Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Salaices M (1999) Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 126(1):111-20
- Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, González MC, McGrath JC, Arribas SM (2003) Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* 552(Pt 1):185-95
- Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E (2005a) Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol* 25(4):155-62
- Briones AM, Salaices M, Vila E (2005b) Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1beta exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev* 126(6-7):710-21
- Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, Quinn MT, Salaices M, Touyz RM (2011) Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens* 5(3):137-53
- Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, Scott S, Rude RK, Hsueh WA (1995) Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. *J Clin Invest* 96(1):354-60
- Buñag RD (1973) Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* 34(2):279-82
- Burke TM, Wolin MS (1987) Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol* 252(4 Pt 2):H721-32

- Cai H (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 68(1):26-36
- Cai H, Li Z, Dikalov S, Holland SM, Hwang J, Jo H, Dudley SC Jr, Harrison DG (2002) NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II. *J Biol Chem* 277(50):48311-7
- Callejas NA, Castrillo A, Boscá L, Martín-Sanz P (1999) Inhibition of prostaglandin synthesis up-regulates cyclooxygenase-2 induced by lipopolysaccharide and peroxisomal proliferators. *J Pharmacol Exp Ther* 288(3):1235-41
- Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1):52-7
- Cao W, Cheng L, Behar J, Biancani P, Harnett KM (2006) IL-1beta signaling in cat lower esophageal sphincter circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(4):G672-80
- Carballo M, Márquez G, Conde M, Martín-Nieto J, Monteseirín J, Conde J, Pintado E, Sobrino F (1999) Characterization of calcineurin in human neutrophils. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF-kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 274(1):93-100
- Carretero OA, Oparil S (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101(3):329-35
- Cediél E, Sanz-Rosa D, Oubina MP, de las Heras N, González Pacheco FR, Vegazo O, Jiménez J, Cachafeiro V, Lahera V (2003) Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(3):R674-81
- Chan SH, Wu KL, Chang AY, Tai MH, Chan JY (2009) Oxidative impairment of mitochondrial electron transport chain complexes in rostral ventrolateral medulla contributes to neurogenic hypertension. *Hypertension* 53(2):217-27
- Chan SH, Wu KL, Kung PS, Chan JY (2010) Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 55(6):1444-53
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(21):13926-31
- Chang L, Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Yang K, Hamblin M, Whitesall SE, D'Alecy LG, Chen YE (2009) Vascular smooth muscle cell-selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion leads to hypotension. *Circulation* 119(16):2161-9
- Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S, Gonzalez-Albert V, Jiménez J, Tormos MC, Espinosa O, Giner V, Iradi A, Saez G, Redon J (2007) Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Am J Hypertens* 20(1):62-9

- Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM (2001) PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7(1):48-52
- Chen K, Chen J, Li D, Zhang X, Mehta JL (2004) Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone. *Hypertension* 44(5):655-61
- Chen R, Liang F, Moriya J, Yamakawa J, Takahashi T, Shen L, Kanda T (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and their agonists for hypertension and heart failure: are the reagents beneficial or harmful? *Int J Cardiol* 130(2):131-9
- Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1998) Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83(9):952-9
- Cheng L, Cao W, Behar J, Biancani P, Harnett KM (2005) Inflammation induced changes in arachidonic acid metabolism in cat LES circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(4):G787-97
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 296(5567):539-41
- Chiarelli F, Di Marzio D (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 4(2):297-304
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ (2003) Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. *Hypertension* 42(6):1206-52
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA (1998) Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31(2):643-8
- Chua CC, Hamdy RC, Chua BH (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by H2O2 in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 25(8):891-7
- Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS (2000) Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 275(42):32681-7
- Cipolla MJ, Bishop N, Vinke RS, Godfrey JA (2010) PPAR{gamma} activation prevents hypertensive remodeling of cerebral arteries and improves vascular function in female rats. *Stroke* 41(6):1266-70

- Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ (2000) The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 164(3):1364-71
- Coats P, Hillier C (1999) Determination of an optimal axial-length tension for the study of isolated resistance arteries on a pressure myograph. *Exp Physiol* 84(6):1085-94
- Combs CK, Johnson DE, Karlo JC, Cannady SB, Landreth GE (2000) Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPARgamma agonists. *J Neurosci* 20(2):558-67
- Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Lüscher TF (2003) High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 107(7):1017-23
- Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, Puri PL (2003) Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: Involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J Cell Physiol* 195(3):402-10
- Courtois E, Marques M, Barrientos A, Casado S, López-Farré A (2003) Lead-induced downregulation of soluble guanylate cyclase in isolated rat aortic segments mediated by reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *J Am Soc Nephrol* 14(6):1464-70
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C (2004) Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 483(1):79-93
- Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH (1999) Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34(4 Pt 2):914-9
- Darley-Usmar V, Halliwell B (1996) Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharm Res* 13(5):649-62
- Davidge ST (2001) Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res* 89(8):650-60
- de Oliveira-Marques V, Cyrne L, Marinho HS, Antunes F (2007) A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. *J Immunol* 178(6):3893-902
- Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R, Muller B (2010) Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* 85(3):582-92
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B (1999a) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274(45):32048-54

- Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B (2000) Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem* 275(47):36703-7
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B (1999b) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85(5):394-402
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J (2001) Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193(7):827-38
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384(6604):39-43
- Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168(5):2508-15
- Dickinson JS, Murphy RC (2002) Mass spectrometric analysis of leukotriene A4 and other chemically reactive metabolites of arachidonic acid. *J Am Soc Mass Spectrom* 13(10):1227-34
- Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL (2002a) PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40(6):866-71
- Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Neves MF, Schiffrin EL (2002b) Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation* 105(19):2296-302
- Diep QN, Schiffrin EL (2001) Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38(2):249-54
- Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK (2008) Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 45(9):1340-51
- Dobrian AD, Schriver SD, Khraibi AA, Prewitt RL (2004) Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension* 43(1):48-56
- Dobrin PB (1978) Mechanical properties of arterises. *Physiol Rev* 58(2):397-460
- Dohi Y, Kojima M, Sato K (1996) Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension* 28(5):732-7

- Donmez G, Derici U, Erbas D, Arinsoy T, Onk A, Sindel S, Hasanoglu E (2002) The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol* 52(5):435-40
- Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefèbvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Korányi L, Laakso M, Mokán M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J; PROactive investigators (2005) Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366(9493):1279-89
- Doroudi R, Gan LM, Selin Sjögren L, Jern S (2000) Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. *Biochem Biophys Res Commun* 269(1):257-64
- Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF, Hamilton CA (1999) Decreased basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol* 379(2-3):175-82
- Duan SZ, Ivashchenko CY, Whitesall SE, D'Alecy LG, Duquaine DC, Brosius FC 3rd, Gonzalez FJ, Vinson C, Pierre MA, Milstone DS, Mortensen RM (2007) Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPARgamma-deficient mice rescued from embryonic lethality. *J Clin Invest* 117(3):812-22
- Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM (2009) PPAR: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(2):128-33
- Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P (2002) Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* 360(9343):1410-8
- Duran-Sandoval D, Thomas AC, Bailleul B, Fruchart JC, Staels B (2003) Pharmacology of PPARalpha, PPARgamma and dual PPARalpha/gamma agonists in clinical development. *Med Sci (Paris)* 19(8-9):819-25
- El Midaoui A, Wu L, Wang R, de Champlain J (2006) Modulation of cardiac and aortic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression by oxidative stress in chronically glucose-fed rats. *Am J Hypertens* 19(4):407-12
- El-Haroun H, Bradbury D, Clayton A, Knox AJ (2004) Interleukin-1beta, transforming growth factor-beta1, and bradykinin attenuate cyclic AMP production by human pulmonary artery smooth muscle cells in response to prostacyclin analogues and prostaglandin E2 by cyclooxygenase-2 induction and downregulation of adenylyl cyclase isoforms 1, 2, and 4. *Circ Res* 94(3):353-61
- Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, Martel-Pelletier J (2002) 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 10(11):845-8

- Faraci FM, Didion SP (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8):1367-73
- Farrajota K, Cheng S, Martel-Pelletier J, Afif H, Pelletier JP, Li X, Ranger P, Fahmi H (2005) Inhibition of interleukin-1beta-induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum* 52(1):94-104
- Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 164(3):894-912
- Félétou M, Vanhoutte PM (2006) Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H985-H1002
- Félétou M, Vanhoutte PM (2007) Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Ann Med* 39(7):495-516
- Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM (2009) Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol* 156(4):563-74
- Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB (1995) Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 95(4):1669-75
- Ferrara A, Lewis JD, Quesenberry CP Jr, Peng T, Strom BL, Van Den Eeden SK, Ehrlich SF, Habel LA (2011) Cohort study of pioglitazone and cancer incidence in patients with diabetes. *Diabetes Care* 34(4):923-9
- Fujiwara T, Ohsawa T, Takahashi S, Ikeda K, Okuno A, Ushiyama S, Matsuda K, Horikoshi H (1998) Troglitazone, a new antidiabetic agent possessing radical scavenging ability, improved decreased skin blood flow in diabetic rats. *Life Sci* 63(22):2039-47
- Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG (1999) Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85(1):23-8
- Fukuda LE, Davel AP, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Cachofeiro V, Lahera V, Rossoni LV (2008) Fenofibrate and pioglitazone do not ameliorate the altered vascular reactivity in aorta of isoproterenol-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 52(5):413-21
- Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, Laursen JB, Capers Q 4th, Taylor WR, Harrison DG, de Leon H, Wilcox JN, Griendling KK (1997) p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 80(1):45-51
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-6

- Galán M, Miguel M, Beltrán AE, Rodríguez C, García-Redondo AB, Rodríguez-Calvo R, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M (2011) Angiotensin II differentially modulates cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and prostaglandin I2 synthase expression in adventitial fibroblasts exposed to inflammatory stimuli. *J Hypertens* 29(3):529-36
- Gao YJ, Hirota S, Zhang DW, Janssen LJ, Lee RM (2003) Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 138(6):1085-92
- Gao YJ, Lee RM (2001) Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A₂ production. *Br J Pharmacol* 134(8):1639-46
- García-Cohen EC, Marin J, Díez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodríguez-Martínez MA (2000) Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J Pharmacol Exp Ther* 293(1):75-81
- García-Redondo AB, Briones AM, Avendaño MS, Hernanz R, Alonso MJ, Salaices M (2009a) Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. *J Hypertens* 27(9):1814-22
- García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, Salaices M (2009b) Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther* 328(1):19-27
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 16(1):23-30
- Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM (1995) Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Circ Res* 76(6):1003-10
- Ghosh M, Wang HD, McNeill JR (2004) Role of oxidative stress and nitric oxide in regulation of spontaneous tone in aorta of DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 141(4):562-73
- Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME (2002) Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol* 16(12):2793-801
- Girouard H, de Champlain J (2004) Inhibitory effect of melatonin on alpha1-adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 17(4):339-46
- Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M (2005) Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol* 146(6):834-45

- Gluais P, Paysant J, Badier-Commander C, Verbeuren T, Vanhoutte PM, Félétou M (2006) In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A₂ as endothelium-derived contracting factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(5):H2255-64
- Godfraind T (2005) Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1464):2259-72
- Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, Kintscher U, Stawowy P, Blaschke F, Graf K, Law RE, Fleck E, Gräfe M (2002) PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem Biophys Res Commun* 293(5):1431-7
- Goetze S, Kintscher U, Kim S, Meehan WP, Kaneshiro K, Collins AR, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nuclear but not cytosolic extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase-regulated steps in vascular smooth muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 38(6):909-21
- Gomez E, Schwendemann C, Roger S, Simonet S, Paysant J, Courchay C, Verbeuren TJ, Félétou M (2008) Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(5):H2198-211
- Grau R, Iñiguez MA, Fresno M (2004) Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *Cancer Res* 64(15):5162-71
- Griendling KK (2004) Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 90(5):491-3
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(10):2175-83
- Gurnell M, Savage DB, Chatterjee VK, O'Rahilly S (2003) The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *J Clin Endocrinol Metab* 88(6):2412-21
- Gutterman DD, Miura H, Liu Y (2005) Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(4):671-8
- Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271(8):4138-42
- Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF (2001) Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37(2 Part 2):529-34
- Hammoud RA, Vaccari CS, Nagamia SH, Khan BV (2007) Regulation of the renin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: a review of the literature. *Vasc Health Risk Manag* 3(6):937-45

- Han S, Inoue H, Flowers LC, Sidell N (2003) Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical cancer cells. *Clin Cancer Res* 9(12):4627-35
- Harrison DG, Gongora MC (2009) Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am* 93(3):621-35
- Hayashi K, Naiki T (2009) Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *J Mech Behav Biomed Mater* 2(1):3-19
- Heinzel B, John M, Klatt P, Böhme E, Mayer B (1992) Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281 (Pt 3):627-30
- Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M (2003) Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 140(4):671-80
- Hernanz R, Briones AM, Martín A, Beltrán AE, Tejerina T, Salaices M, Alonso MJ (2008) Ouabain treatment increases nitric oxide bioavailability and decreases superoxide anion production in cerebral vessels. *J Hypertens* 26(10):1944-54
- Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, Brandes RP (2008) Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51(2):211-7
- Hirano K (2007) Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* 104(2):109-15
- Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH, Yen MH (2001) Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38(5):1044-8
- Houston MC (2005) Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 47(6):396-449
- Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB (2002) Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303(2):563-73
- Huang AL, Vita JA (2006) Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation. *Trends Cardiovasc Med* 16(1):15-20
- Hutri-Kähönen N, Kähönen M, Wu X, Sand J, Nordback I, Taurio J, Pörsti I (1999) Control of vascular tone in isolated mesenteric arterial segments from hypertensive patients. *Br J Pharmacol* 127(7):1735-43
- Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(4):C899-905

- Hwang J, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Campbell AG, Thulé PM, Sutliff RL, Hart CM (2007) The PPARgamma ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice. *Vascul Pharmacol* 46(6):456-62
- Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL (2003) Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(1):45-51
- Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G (1988) Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 246(1):218-26
- Ikawa H, Kameda H, Kamitani H, Baek SJ, Nixon JB, Hsi LC, Eling TE (2001) Effect of PPAR activators on cytokine-stimulated cyclooxygenase-2 expression in human colorectal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 267(1):73-80
- Ikeda U, Shimpo M, Murakami Y, Shimada K (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 35(6):1232-6
- Inoue H, Tanabe T, Umesono K (2000) Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 275(36):28028-32
- Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, Komoda T, Katayama S (2001) The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 50(1):3-11
- Intengan HD, Schiffrin EL (2000) Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36(3):312-8
- Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A (2002) Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension* 40(5):687-93
- Ishihara Y, Sekine M, Hatano A, Shimamoto N (2008) Sustained contraction and endothelial dysfunction induced by reactive oxygen species in porcine coronary artery. *Biol Pharm Bull* 31(9):1667-72
- Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347(6294):645-50
- Itoh H, Doi K, Tanaka T, Fukunaga Y, Hosoda K, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Yamori Y, Nakao K (1999) Hypertension and insulin resistance: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7):558-60
- Izumi Y, Kim S, Zhan Y, Namba M, Yasumoto H, Iwao H (2000) Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 36(4):511-6

- Jacob MP (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 57(5-6):195-202
- Jaimes EA, Tian RX, Pearse D, Raij L (2005) Up-regulation of glomerular COX-2 by angiotensin II: role of reactive oxygen species. *Kidney Int* 68(5):2143-53
- Jaimes EA, Zhou MS, Pearse DD, Puzis L, Raij L (2008) Upregulation of cortical COX-2 in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II and reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(2):F385-92
- Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Cohen RA (2004) Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK. *J Biol Chem* 279(19):20363-8
- Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E (2006) Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 316(1):42-52
- Johnson F, Giulivi C (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med* 26(4-5):340-52
- Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H (2005) Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid Redox Signal* 7(3-4):395-403
- Kalajdzic T, Faour WH, He QW, Fahmi H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Di Battista JA (2002) Nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor, suppresses peroxisome proliferator-activated receptor induction of cyclooxygenase 2 gene expression in human synovial fibroblasts: evidence for receptor antagonism. *Arthritis Rheum* 46(2):494-506
- Kang YJ, Kim HS, Choi HC (2008) Troglitazone increases IL-1beta induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression via enhanced phosphorylation of IkkappaBalpha in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 31(10):1955-8
- Kanie N, Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K (2003) Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR alpha and PPAR gamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 140(1):23-32
- Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, Mizuno K, Fujita T, Tsukamoto K, Watanabe T (1999) Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPARgamma in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 258(2):431-5
- Kawasaki J, Hirano K, Nishimura J, Fujishima M, Kanaide H (1998) Mechanisms of vasorelaxation induced by troglitazone, a novel antidiabetic drug, in the porcine coronary artery. *Circulation* 98(22):2446-52
- Khan BV, Navalkar S, Khan QA, Rahman ST, Parthasarathy S (2001) Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates the vascular oxidative state in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 38(6):1662-7

- Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL (1998) Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 26(5):612-20
- Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A (2002) Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 51(5):1507-14
- Kim DK, Huh JE, Lee SH, Hong KP, Park JE, Seo JD, Lee WR (1999) Angiotensin II stimulates proliferation of adventitial fibroblasts cultured from rat aortic explants. *J Korean Med Sci* 14(5):487-96
- Klein T, Shephard P, Kleinert H, Kömhoff M (2007) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 1773(11):1605-18
- Klotz L, Diehl L, Dani I, Neumann H, von Oppen N, Dolf A, Endl E, Klockgether T, Engelhardt B, Knolle P (2007) Brain endothelial PPARgamma controls inflammation-induced CD4+ T cell adhesion and transmigration in vitro. *J Neuroimmunol* 190(1-2):34-43
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007) The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev* 59(3):251-87
- Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Kukharsky V, Bazela K, Kwiecien S, Harsch I, Konturek SJ, Hahn EG (2003) Pioglitazone, a specific ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces gastric mucosal injury induced by ischaemia/ reperfusion in rat. *Scand J Gastroenterol* 38(5):468-76
- Korn SH, Wouters EF, Vos N, Janssen-Heininger YM (2001) Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of I-kappaB kinase. *J Biol Chem* 276(38):35693-700
- Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD (2005) An overview on biological mechanisms of PPAR. *Pharmacol Res* 51(2):85-94
- Kourie JI (1998) Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1):C1-24
- Kusama N, Kajikuri J, Yamamoto T, Watanabe Y, Suzuki Y, Katsuya H, Itoh T (2005) Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration. *Br J Pharmacol* 146(4):487-97
- Lacroix S, Rivest S (1998) Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem* 70(2):452-66
- Lacy F, Gough DA, Schmid-Schönbein GW (1998) Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 25(6):720-7

- Lagaud G, Davies KP, Venkateswarlu K, Christ GJ (2002) The physiology, pathophysiology and therapeutic potential of gap junctions in smooth muscle. *Curr Drug Targets* 3(6):427-40
- Lakshminarayanan V, Drab-Weiss EA, Roebuck KA (1998) H₂O₂ and tumor necrosis factor- α induce differential binding of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B to the interleukin-8 promoter in endothelial and epithelial cells. *J Biol Chem* 273(49):32670-8
- LaPointe MC, Isenović E (1999) Interleukin-1 β regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 33(1 Pt 2):276-82
- Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL (2008) Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10(9):1631-74
- Le Marquer-Domagala F, Finet M (1997) Comparison of the nitric oxide and cyclo-oxygenase pathway in mesenteric resistance vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 121(3):588-94
- Ledingham JM, Laverty R (2005) Effects of glitazones on blood pressure and vascular structure in mesenteric resistance arteries and basilar artery from genetically hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32(11):919-25
- Lee DL, Webb RC, Jin L (2004) Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension* 44(6):796-9
- Lee MY, Griendling KK (2008) Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10(6):1045-59
- Lee S, Ha IS, Kim JH, Park KS, Han KH, Kim SH, Chae YC, Kim SH, Kim YH, Suh PG, Ryu SH, Kim JE, Bang K, Hwang JI, Yang J, Park KW, Chung J, Ahn C (2008) Hydrogen peroxide-induced VCAM-1 expression in pancreatic islets and beta-cells through extracellular Ca²⁺ influx. *Transplantation* 86(9):1257-66
- Lee TI, Kao YH, Chen YC, Chen YJ (2009) Proinflammatory cytokine and ligands modulate cardiac peroxisome proliferator-activated receptors. *Eur J Clin Invest* 39(1):23-30
- Leibovitz E, Schiffrin EL (2007) PPAR activation: a new target for the treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 50(2):120-5
- Leibowitz MD, Fiévet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J (2000) Activation of PPAR δ alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 473(3):333-6
- Leung HS, Leung FP, Yao X, Ko WH, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y (2006) Endothelial mediators of the acetylcholine-induced relaxation of the rat femoral artery. *Vascul Pharmacol* 44(5):299-308

- Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP Jr, Vaughn DJ, Nessel L, Selby J, Strom BL (2011) Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34(4):916-22
- Li H, Förstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190(3):244-54
- Li J, Li W, Liu W, Altura BT, Altura BM (2004) Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 499(1-2):171-8
- Li M, Pascual G, Glass CK (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 20(13):4699-707
- Li R, Zhang H, Wang W, Wang X, Huang Y, Huang C, Gao F (2010) Vascular insulin resistance in prehypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling. *Eur J Pharmacol* 628(1-3):140-7
- Li WG, Miller FJ Jr, Zhang HJ, Spitz DR, Oberley LW, Weintraub NL (2001) H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem* 276(31):29251-6
- Lin L, Nasjletti A (1991) Role of endothelium-derived prostanoid in angiotensin-induced vasoconstriction. *Hypertension* 18(2):158-64
- Liu D, Zeng BX, Zhang SH, Yao SL (2005) Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. *Inflamm Res* 54(11):464-70
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25(4):402-8
- Llorens S, Mendizabal Y, Nava E (2007) Effects of pioglitazone and rosiglitazone on aortic vascular function in rat genetic hypertension. *Eur J Pharmacol* 575(1-3):105-12
- Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB (1993) Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1):L406-12
- Lo YY, Wong JM, Cruz TF (1996) Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH₂-terminal kinases. *J Biol Chem* 271(26):15703-7
- Lu X, Guo X, Karathanasis SK, Zimmerman KM, Onyia JE, Peterson RG, Kassab GS (2010a) Rosiglitazone reverses endothelial dysfunction but not remodeling of femoral artery in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Diabetol* 9-19
- Lu X, Murphy TC, Nanes MS, Hart CM (2010b) PPAR_γ regulates hypoxia-induced Nox4 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells through NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299(4):L559-66
- Lu Y, Wahl LM (2005) Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E₂ through enhancement of NF- κ B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol* 175(8):5423-9

- Lyle AN, Griendling KK (2006) Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)* 21:269-80
- Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M (2010) Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396(4):901-7
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL (2008) Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 29(7):367-74
- Marín J (1993) Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol* 13(2):127-76
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA (1995) Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* 15(4):279-307
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA (1997) Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 75(2):111-34
- Martens FM, Visseren FL, Lemay J, de Koning EJ, Rabelink TJ (2002) Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* 62(10):1463-80
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 92(4):1866-74
- Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B (2004) Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res* 94(9):1168-78
- Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J (2002) PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* 90(6):703-10
- Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J (1999) PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 99(24):3125-31
- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106(12):1521-30
- Matrougui K, Maclouf J, Lévy BI, Henrion D (1997) Impaired nitric oxide- and prostaglandin-mediated responses to flow in resistance arteries of hypertensive rats. *Hypertension* 30(4):942-7
- Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K (2008) Relationships among ET-1, PPARgamma, oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic animals. *J Smooth Muscle Res* 44(2):41-55

- Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K (2007) Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 42(7):993-1007
- Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C (2005) Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 112(17):2677-85
- McCormick C, Jones RL, Kennedy S, Wadsworth RM (2010) Activation of prostanoid EP receptors by prostacyclin analogues in rabbit iliac artery: implications for anti-restenotic potential. *Eur J Pharmacol* 641(2-3):160-7
- McGuire DK, Winterfield JR, Rytlewski JA, Ferrannini E (2008) Blocking the renin-angiotensin-aldosterone system to prevent diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 5(1):59-66
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999) Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274(12):8328-34
- Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D (2003) Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(12):2203-8
- Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1):C82-97
- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem J* 263(2):539-45
- Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC (2003) Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol Toxicol* 19(4):203-14
- Mendez M, LaPointe MC (2003) PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension* 42(4):844-50
- Meng S, Roberts LJ 2nd, Cason GW, Curry TS, Manning RD Jr (2002) Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(3):R732-8
- Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196(3):430-43
- Miller FJ Jr, Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS (2007) Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res* 101(7):663-71
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS (2008) Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 93(1):141-7
- Mombouli JV, Vanhoutte PM (1997) Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 18(7):252-6

- Moncada S, Higgs EA (2006) Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* (176 Pt 1):213-54
- Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S (1994) Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(14):6702-6
- Morrow JD, Roberts LJ (1997) The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 36(1):1-21
- Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC (2000) NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension* 35(1 Pt 2):193-201
- Mulvany MJ (1999) Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* 41(1):9-13
- Mulvany MJ (2008) Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput* 46(5):461-7
- Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41(1):19-26
- Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A (2005) Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(8):1551-7
- Murao K, Imachi H, Momoi A, Sayo Y, Hosokawa H, Sato M, Ishida T, Takahara J (1999) Thiazolidinedione inhibits the production of monocyte chemoattractant protein-1 in cytokine-treated human vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 454(1-2):27-30
- Nabha L, Garbern JC, Buller CL, Charpie JR (2005) Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 27(1):71-82
- Nakajima T, Tanaka N, Li G, Hu R, Kamijo Y, Hara A, Aoyama T (2010) Effect of bezafibrate on hepatic oxidative stress: comparison between conventional experimental doses and clinically-relevant doses in mice. *Redox Rep* 15(3):123-30
- Nakamura T, Sakamoto K (2001) Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284(1):203-10
- Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2007) Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke* 38(11):3016-22
- Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S (2008) Beneficial effects of pioglitazone on hypertensive cardiovascular injury are enhanced by combination with candesartan. *Hypertension* 51(2):296-301

- Nakao N, Kurokawa T, Nonami T, Tumurkhuu G, Koide N, Yokochi T (2008) Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- α in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immun* 14(3):190-6
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79(4):1193-226
- Nathan C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100(10):2417-23
- Neve BP, Fruchart JC, Staels B (2000) Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 60(8):1245-50
- Newby AC (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85(1):1-31
- Nicol CJ, Adachi M, Akiyama TE, Gonzalez FJ (2005) PPAR γ in endothelial cells influences high fat diet-induced hypertension. *Am J Hypertens* 18(4 Pt 1):549-56
- Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J (1994) Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med* 331(18):1188-93
- Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Engelhardt JF, Sunagawa K (2007) Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 50(1):62-8
- O'Brien AJ, Wilson AJ, Sibbald R, Singer M, Clapp LH (2001) Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. *Br J Pharmacol* 133(3):351-60
- Ogihara T, Rakugi H, Ikegami H, Mikami H, Masuo K (1995) Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *Am J Hypertens* 8(3):316-20
- Ohtsubo T, Rovira II, Starost MF, Liu C, Finkel T (2004) Xanthine oxidoreductase is an endogenous regulator of cyclooxygenase-2. *Circ Res* 95(11):1118-24
- Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM (2001) A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(9):5306-11
- Oshio H, Abe T, Onogawa T, Ohtsuka H, Sato T, Ii T, Fukase K, Muto M, Katayose Y, Oikawa M, Rikiyama T, Egawa S, Unno M (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines. *J Gastroenterol* 43(7):538-49
- Osol G, Cipolla M, Knutson S (1989) A new method for mechanically denuding the endothelium of small (50-150 microns) arteries with a human hair. *Blood Vessels* 26(5):320-4

- Paik JH, Ju JH, Lee JY, Boudreau MD, Hwang DH (2000) Two opposing effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the expression of the inducible cyclooxygenase. Mediation through different signaling pathways. *J Biol Chem* 275(36):28173-9
- Paravicini TM, Touyz RM (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71(2):247-58
- Paravicini TM, Touyz RM (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2:S170-80
- Park KG, Lee KM, Chang YC, Magae J, Ando K, Kim KB, Kim YN, Kim HS, Park JY, Lee KU, Lee IK (2006) The ascochlorin derivative, AS-6, inhibits TNF-alpha-induced adhesion molecule and chemokine expression in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 80(2):120-6
- Pauletto P, Rattazzi M (2006) Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant* 21(4):850-3
- Paumelle R, Blanquart C, Briand O, Barbier O, Duhem C, Woerly G, Percevault F, Fruchart JC, Dombrowicz D, Glineur C, Staels B (2006) Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. *Circ Res* 98(3):361-9
- Pechánová O, Zicha J, Kojsová S, Dobesová Z, Jendeková L, Kunes J (2006) Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond)* 110(2):235-42
- Peng H, Chen P, Cai Y, Chen Y, Wu QH, Li Y, Zhou R, Fang X (2008) Endothelin-1 increases expression of cyclooxygenase-2 and production of interleukin-8 in human pulmonary epithelial cells. *Peptides* 29(3):419-24
- Peng T, Lu X, Feng Q (2005) NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. *FASEB J* 19(2):293-5
- Peredo HA, Mayer MA, Carranza A, Puyó AM (2008) Pioglitazone and losartan modify hemodynamic and metabolic parameters and vascular prostanoids in fructose-overloaded rats. *Clin Exp Hypertens* 30(2):159-69
- Pérez Girón, José Vicente (2009) Regulación por PPAR γ de la expresión vascular de COX-2 asociada a la respuesta inflamatoria con la hipertensión. Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular
- Peskar BM (2005) Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology* 13(1-3):15-26
- Polizio AH, Peña C (2005) Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regul Pept* 128(1):1-5
- Pontsler AV, St Hilaire A, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM (2002) Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 277(15):13029-36

- Potenza MA, Gagliardi S, De Benedictis L, Zigrino A, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Lorusso L, Benagiano V, Quon MJ, Montagnani M (2009) Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone ameliorates cardiovascular pathophysiology via antioxidant mechanisms in the vasculature. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(3):E685-94
- Püntmann VO, Hussain MB, Mayr M, Xu Q, Singer DR (2005) Role of oxidative stress in angiotensin-II mediated contraction of human conduit arteries in patients with cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 43(4):277-82
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97(8):1916-23
- Rapoport RM, Williams SP (1996) Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 28(1):64-75
- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT (2003) Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 41(5):1096-101
- Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ (2001) Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res* 89(5):408-14
- Rhodin (1980) En: Handbook of physiology the cardiovascular system, volumen II. Bohr, Somlyo, Sparks Eds. American Physiological Society. Bethesda, Maryland 1980
- Ricote M, Glass CK (2007) PPAR and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771(8):926-35
- Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13):7614-9
- Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK (1999) The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 66(5):733-9
- Rival Y, Puech L, Taillandier T, Benéteau N, Rouquette A, Lestienne F, Dupont-Passelaigue E, Le Roy I, Patoiseau JF, Junquéro D (2009) PPAR activators and COX inhibitors selectively block cytokine-induced COX-2 expression and activity in human aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 606(1-3):121-9
- Rizzoni D, Palombo C, Porteri E, Muiesan ML, Kozàková M, La Canna G, Nardi M, Guelfi D, Salvetti M, Morizzo C, Vittone F, Rosei EA (2003) Relationships between coronary flow vasodilator capacity and small artery remodelling in hypertensive patients. *J Hypertens* 21(3):625-31

- Rodríguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, Palomer X, Laguna JC, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal-related kinase 1/2. *Diabetes* 57(8):2149-57
- Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaíces M, Marín J (1998) Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 125(6):1329-35
- Rodríguez-Martínez MA, Ruiz-Torres A (1992) Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev* 66(2):213-22
- Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ (2002a) Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. *Br J Pharmacol* 135(3):771-81
- Rossoni LV, Salaices M, Miguel M, Briones AM, Barker LA, Vassallo DV, Alonso MJ (2002b) Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5):H2110-8
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J (2006) Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(2):159-66
- Russell A, Banes A, Berlin H, Fink GD, Watts SW (2002) 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-L-arginine hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 303(1):179-87
- Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD (2004) PPAR(gamma) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension* 43(3):661-6
- San José G, Bidegain J, Robador PA, Díez J, Fortuño A, Zalba G (2009) Insulin-induced NADPH oxidase activation promotes proliferation and matrix metalloproteinase activation in monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 46(8):1058-67
- Sánchez-Gómez FJ, Cernuda-Morollón E, Stamatakis K, Pérez-Sala D (2004) Protein thiol modification by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 addition in mesangial cells: role in the inhibition of pro-inflammatory genes. *Mol Pharmacol* 66(5):1349-58
- Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C (2005) Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 69(12):1733-44
- Sánchez-López E, López AF, Esteban V, Yagüe S, Egido J, Ruiz-Ortega M, Alvarez-Arroyo MV (2005) Angiotensin II regulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1alpha induction and redox mechanisms in the kidney. *Antioxid Redox Signal* 7(9-10):1275-84

- Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, Lahera V, Cachofeiro V (2005) Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(1):H111-5
- Sarafidis PA, Nilsson PM (2006) The effects of thiazolidinediones on blood pressure levels - a systematic review. *Blood Press* 15(3):135-50
- Sato A, Sakuma I, Gutterman DD (2003) Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(6):H2345-54
- Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T (1999) Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 254(3):757-63
- Savoia C, Schiffrin EL (2006) Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(2):152-8
- Sawano H, Haneda M, Sugimoto T, Inoki K, Koya D, Kikkawa R (2002) 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 61(6):1957-67
- Scher JU, Pillinger MH (2005) 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114(2):100-9
- Schiffrin EL (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43(1):19-29
- Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42(4):664-8
- Schildknecht S, Ullrich V (2009) Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 84(2):183-9
- Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM (2004) Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation* 110(24):3680-6
- Schulz E, Gori T, Münzel T (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 34(6):665-73
- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res* 91(5):406-13
- Shi Y, Feletou M, Ku DD, Man RY, Vanhoutte PM (2007) The calcium ionophore A23187 induces endothelium-dependent contractions in femoral arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* 150(5):624-32
- Shimaya A, Noshiro O, Hirayama R, Yoneta T, Niigata K, Shikama H (1997) Insulin sensitizer YM268 ameliorates insulin resistance by normalizing the decreased content of GLUT4 in adipose tissue of obese Zucker rats. *Eur J Endocrinol* 137(6):693-700

- Shimokawa H, Morikawa K (2005) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol* 39(5):725-32
- Shinzato T, Ohya Y, Nakamoto M, Ishida A, Takishita S (2007) Beneficial effects of pioglitazone on left ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *Hypertens Res* 30(9):863-73
- Siflinger-Birnboim A, Goligorsky MS, Del Vecchio PJ, Malik AB (1992) Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. *Lab Invest* 67(1):24-30
- Silva-Junior Gde O, Torres Tda S, Mendonca Lde S, Mandarim-de-Lacerda CA (2011) Rosiglitazone (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma) counters hypertension and adverse cardiac and vascular remodeling in 2K1C hypertensive rats. *Exp Toxicol Pathol* (1-2):1-7
- Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH (1998) Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 275(6 Pt 1):C1640-52
- Smith WL, Langenbach R (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107(12):1491-5
- Soma M, Manku MS, Jenkins DK, Horrobin DF (1985) Prostaglandins and thromboxane outflow from the perfused mesenteric vascular bed in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins* 29(2):323-33
- Sommer M, Wolf G (2007) Rosiglitazone increases PPARgamma in renal tubular epithelial cells and protects against damage by hydrogen peroxide. *Am J Nephrol* 27(4):425-34
- Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, Müller M, Schulz S, Kirchhoff N, Doerries C, Horváth T, Limbourg A, Limbourg F, Fliser D, Haller H, Drexler H, Landmesser U (2007) Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 116(2):163-73
- Staels B (2007) PPAR agonists and the metabolic syndrome. *Therapie* 62(4):319-26
- Staels B, Fruchart JC (2005) Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 54(8):2460-70
- Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A (1998) Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 393(6687):790-3
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK (2000) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(9):4844-9

- Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem* 276(15):12440-8
- Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Sato K, Kudo M, Taniyama Y, Ito S (2001) Differential effects among thiazolidinediones on the transcription of thromboxane receptor and angiotensin II type 1 receptor genes. *Hypertens Res* 24(3):229-33
- Sugiyama Y, Taketomi S, Shimura Y, Ikeda H, Fujita T (1990) Effects of pioglitazone on glucose and lipid metabolism in Wistar fatty rats. *Arzneimittelforschung* 40(3):263-7
- Sung B, Park S, Yu BP, Chung HY (2006) Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPARgamma activator: suppression of NF-kappaB by 2,4-thiazolidinedione. *Exp Gerontol* 41(6):590-9
- Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, Suematsu M, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW (1998) Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(8):4754-9
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM (2004) Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(2):200-8
- Taddei S, Vanhoutte PM (1993) Role of endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. *Hypertension* 21(1):9-15
- Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A (1997) Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension* 29(1 Pt 2):274-9
- Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102(15):1834-9
- Tamura K, Sakurai T, Kogo H (2006) Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 44(6):411-6
- Tang EH, Vanhoutte PM (2008) Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics* 32(3):409-18
- Taniyama Y, Griendling KK (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42(6):1075-81
- Tao L, Liu HR, Gao E, Teng ZP, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL, Batinic-Haberle I, Willette RN, Ohlstein EH, Yue TL (2003) Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia. *Circulation* 108(22):2805-11

- Teissier E, Nohara A, Chinetti G, Paumelle R, Cariou B, Fruchart JC, Brandes RP, Shah A, Staels B (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. *Circ Res* 95(12):1174-82
- Telò P, Lostaglio S, Dejana E (1997) Structure of intercellular junctions in the endothelium. *Therapie* 52(5):395-8
- Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Rutledge JC (2002) Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPAR. *Physiol Genomics* 11(1):21-30
- Tham DM, Wang YX, Rutledge JC (2003) Modulation of vascular inflammation by PPAR. *Drug News Perspect* 16(2):109-16
- Tomida T, Numaguchi Y, Nishimoto Y, Tsuzuki M, Hayashi Y, Imai H, Matsui H, Okumura K (2003) Inhibition of COX-2 prevents hypertension and proteinuria associated with a decrease of 8-iso-PGF2alpha formation in L-NAME-treated rats. *J Hypertens* 22(3):601-9
- Touyz RM (2005) Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 90(4):449-55
- Touyz RM, Schiffrin EL (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52(4):639-72
- Touyz RM, Schiffrin EL (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122(4):339-52
- Touyz RM, Schiffrin EL (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 45(1):19-28
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 38(10):1654-61
- Tschudi MR, Mesaros S, Lüscher TF, Malinski T (1996) Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27(1):32-5
- Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem* 101(1):41-56
- Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U (2003) Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 59(2):488-500
- Uracz W, Uracz D, Olszanecki R, Gryglewski RJ (2002) Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol Pharmacol* 53(4 Pt 1):643-54

- Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2(8670):997-1000
- Vane JR (2002) Biomedicine. Back to an aspirin a day? *Science* 296(5567):474-5
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL (2000a) Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 36(6):957-64
- Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F, Rad B (2000b) Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 36(1):142-6
- Vila E, Salaices M (2005) Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(3):H1016-21
- Villegas I, Martín AR, Toma W, de la Lastra CA (2004) Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *Eur J Pharmacol* 505(1-3):195-203
- Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M (2009) Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension* 53(6):1008-16
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL (2004) Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 22(3):535-42
- Virdis A, Schiffrin EL (2003) Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12(2):181-7
- Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Kanda T, Homma K, Yoshioka K, Sugano N, Saruta T (2005) Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats. *Hypertens Res* 28(3):255-62
- Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275(29):22435-41
- Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G (1999) The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes* 48(7):1448-53
- Wang X, Li F, Fan C, Wang C, Ruan H (2010) Analysis of isoform specific ERK signaling on the effects of interleukin-1 β on COX-2 expression and PGE2 production in human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 402(1):23-9
- Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113(2):159-70

- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44(4):381-6
- Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27(1-4):201-6
- Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M (2008) Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(3):H1033-H1043
- Williams HC, Griendling KK (2007) NADPH oxidase inhibitors: new antihypertensive agents? *J Cardiovasc Pharmacol* 50(1):9-16
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR (2000) COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355(9204):646-8
- Willson TM, Lambert MH, Kliewer SA (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu Rev Biochem* 70:341-67
- Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA (2002) Superoxide in the vascular system. *J Vasc Res* 39(3):191-207
- Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S (2001) Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(5):R1343-60
- Wu L, Wang R, De Champlain J, Wilson TW (2004) Beneficial and deleterious effects of rosiglitazone on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 17(9):749-56
- Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J (2001) Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19(4):741-8
- Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, Campo LD, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M, Balfagón G (2008) Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A₂ and prostacyclin. *Br J Pharmacol* 154(6):1225-35
- Xavier FE, Blanco-Rivero J, Ferrer M, Balfagón G (2009) Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I₂ in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP1 and TP receptors. *Br J Pharmacol* 158(7):1787-95
- Xavier FE, Rossoni LV, Alonso MJ, Balfagón G, Vassallo DV, Salaices M (2004) Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 143(1):215-25

- Xiang L, Dearman J, Abram SR, Carter C, Hester RL (2008) Insulin resistance and impaired functional vasodilation in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(4):H1658-66
- Xiong C, Mou Y, Zhang J, Fu M, Chen YE, Akinbami MA, Cui T (2005) Impaired expression of PPAR gamma protein contributes to the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 77(24):3037-48
- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F (2003) Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 107(7):1040-5
- Yamashita A, Shoji K, Tsuruda T, Furukoji E, Takahashi M, Nishihira K, Tamura S, Asada Y (2008) Medial and adventitial macrophages are associated with expansive atherosclerotic remodeling in rabbit femoral artery. *Histol Histopathol* 23(2):127-36
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332(6163):411-5
- Yang D, Félétou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM (2002) Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 136(1):104-10
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL (2000) Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 275(7):4541-4
- Ye Y, Lin Y, Atar S, Huang MH, Perez-Polo JR, Uretsky BF, Birnbaum Y (2006) Myocardial protection by pioglitazone, atorvastatin, and their combination: mechanisms and possible interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(3):H1158-69
- Yoneyama H, Yamamoto A, Kosaka H (2001) Neuronal nitric oxide synthase generates superoxide from the oxygenase domain. *Biochem J* 360(Pt 1):247-53
- Yoshimoto T, Naruse M, Nishikawa M, Naruse K, Tanabe A, Seki T, Imaki T, Demura R, Aikawa E, Demura H (1997) Antihypertensive and vasculo- and renoprotective effects of pioglitazone in genetically obese diabetic rats. *Am J Physiol* 272(6 Pt 1):E989-96
- Yu X, Shao XG, Sun H, Li YN, Yang J, Deng YC, Huang YG (2008) Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1200:146-58
- Yue TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Brill A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH (2001) In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 104(21):2588-94

- Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Díez J (2001) Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 1:2-5
- Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J (2000) Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35(5):1055-61
- Zerrouk A, Auguet M, Chabrier PE (1998) Augmented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. *J Cardiovasc Pharmacol* 31(4):525-33
- Zhang J, Fang NY, Gao PJ, Wu LY, Han WQ, Guo SJ, Shen WL, Zhu DL (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists attenuate angiotensin II-induced collagen type I expression in adventitial fibroblasts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(1):72-7
- Zhang L, Xie P, Wang J, Yang Q, Fang C, Zhou S, Li J (2010) Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J Biol Chem* 285(18):13666-77
- Zhao Y, Patzer A, Herdegen T, Gohlke P, Culman J (2006) Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB J* 20(8):1162-75
- Zhou MS, Jaimes EA, Raij L (2004) Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* 44(2):186-90
- Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Kosaka H (1999) Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 34(1):39-43
- Zhou XF, Cui J, DeStefano AL, Chazaro I, Farrer LA, Manolis AJ, Gavras H, Baldwin CT (2005) Polymorphisms in the promoter region of catalase gene and essential hypertension. *Dis Markers* 21(1):3-7
- Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber AA (1998) Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 54(3):536-40
- Zingarelli B, Cook JA (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* 23(5):393-9
- Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA (2003) Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 171(12):6827-37

ANEXO

Journal of Hypertension

PPAR γ activation reduces COX-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JH-D-10-00477R2
Full Title:	PPAR γ activation reduces COX-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress
Article Type:	Original Manuscript
Keywords:	pioglitazone; COX-2; oxidative stress; NF- κ B; vascular smooth muscle cells
Corresponding Author:	María J. Alonso, PhD Universidad Rey Juan Carlos Alcorcón, Madrid SPAIN
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad Rey Juan Carlos
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Angela Martin, BSc
First Author Secondary Information:	
All Authors:	Angela Martin, BSc Jose V Pérez-Girón, PhD Raquel Hernanz, PhD Roberto Palacios, BSc Ana M Briones, PhD Ana Fortuño, PhD Guillermo Zalba, PhD Mercedes Salaices, PhD María J. Alonso, PhD
All Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Aims: Hypertension is associated with increased plasma inflammatory markers such as cytokines and increased vascular cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. The ability of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) agonists to reduce oxidative stress seems to contribute to their anti-inflammatory properties. This study analyzes the effect of pioglitazone, a PPARγ agonist, on interleukin-1β-induced COX-2 expression and the role of reactive oxygen species (ROS) on this effect.</p> <p>Methods and results: Vascular smooth muscle cells from hypertensive rats stimulated with interleukin-1β (10 ng/mL, 24 h) were used. Interleukin-1β increased: 1) COX-2 protein and mRNA levels; 2) protein and mRNA levels of the NADPH oxidase subunit NOX-1, NADPH oxidase activity and ROS production; and 3) IKK phosphorylation, nuclear expression of the p65 NF-κB subunit and cell proliferation, all of which were reduced by apocynin (30 μmol/L). Interleukin-1β-induced COX-2 expression was reduced by apocynin, tempol (10 μmol/L), catalase (1000 U/mL) and lactacystin (5 μmol/L). Moreover, H₂O₂ (50 μmol/L, 90 min) induced COX-2 expression, which was reduced by lactacystin. Pioglitazone (10 μmol/L) reduced the effects of interleukin-1β on: 1) COX-2 protein and mRNA levels; 2) NOX-1 protein and mRNA levels, NADPH oxidase activity and ROS production; and 3) p-IKK, p65 expressions and cell proliferation. Pioglitazone also reduced the H₂O₂-induced-COX-2 expression and increased Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase protein expression. PPARγ siRNA (5 nmol/L) further increased interleukin-1β-induced COX-2 and NOX-1 mRNA levels. In</p>

addition, pioglitazone increased the interleukin-1 β -induced PPAR γ mRNA levels.
Conclusion: PPAR γ activation with pioglitazone reduces interleukin-1 β -induced COX-2 expression by interference with the redox-sensitive transcription factor NF-kappaB.

Condensed Abstract

We analyzed the effect of pioglitazone on interleukin-1 β -induced COX-2 expression and the role of reactive oxygen species (ROS) on this effect in VSMC from SHR. Interleukin-1 β increased: 1) NOX-1 protein and mRNA levels; 2) NADPHox activity and ROS production; and 3) p-IKK and p65 NF- κ B nuclear expression. Apocynin, catalase and lactacystin reduced the interleukin-1 β -induced COX-2 expression. Pioglitazone reduced the effects of interleukin-1 β on: 1) COX-2 and NOX-1; 2) NADPHox activity and ROS production; and 3) p-IKK and p65 nuclear expression. PPAR γ siRNA increased both interleukin-1 β -induced COX-2 and NOX-1 mRNA levels. Summarizing, pioglitazone reduces interleukin-1 β -induced COX-2 expression probably by NF- κ B interference.

List of non-standard abbreviations: ROS: reactive oxygen species; H₂O₂: hydrogen peroxide; O₂⁻: superoxide anion; COX: cyclooxygenase; VSMC: vascular smooth muscle cells; SHR: spontaneously hypertensive rats; PPARs: Peroxisome-proliferator activated receptors; IL-1β: interleukin-1β; SOD: superoxide dismutase

PPAR γ activation reduces COX-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress

Angela Martín^{a,*}, José V. Pérez-Girón^{a,*}, Raquel Hernanz^a, Roberto Palacios^a, Ana M. Briones^b, Ana Fortuño^c, Guillermo Zalba^c, Mercedes Salaices^b, María J. Alonso^a

*These authors equally contributed to this study

^aDepto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos,

^bDepto. de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, ^cDivisión de Ciencias Cardiovasculares, Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

Short title: vascular PPAR γ and COX-2 in hypertension

Part of this work was previously presented at the XXXI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, Sevilla, Spain 2009

This study was supported by Fundación Mutua Madrileña, Ministerio de Ciencia e Innovación [SAF2009-07201, SAF2007-62553], Instituto de Salud Carlos III [Red RECAVA, RD06/0014/0011, RD006/0014/0008] and Sociedad Española de Farmacología-Almirall Prodesfarma. AMB is supported through the Ramon y Cajal program (RYC-2010-06473).

Conflicts of interest: None declared

Correspondence to: Dr. María J. Alonso

Depto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos
Avda. de Atenas s/n, 28922 Alcorcón, Spain

Phone: 00-34-91-4888875; Fax: 00-34-91-4888831; e-mail: mariajesus.alonso@urjc.es

Manuscript Word count: 7109

Number of figures: 6

Abstract

Aims: Hypertension is associated with increased plasma inflammatory markers such as cytokines and increased vascular cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. The ability of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonists to reduce oxidative stress seems to contribute to their anti-inflammatory properties. This study analyzes the effect of pioglitazone, a PPAR γ agonist, on interleukin-1 β -induced COX-2 expression and the role of reactive oxygen species (ROS) on this effect.

Methods and results: Vascular smooth muscle cells from hypertensive rats stimulated with interleukin-1 β (10 ng/mL, 24 h) were used. Interleukin-1 β increased: 1) COX-2 protein and mRNA levels; 2) protein and mRNA levels of the NADPH oxidase subunit NOX-1, NADPH oxidase activity and ROS production; and 3) IKK phosphorylation, nuclear expression of the p65 NF- κ B subunit and cell proliferation, all of which were reduced by apocynin (30 μ mol/L). Interleukin-1 β -induced COX-2 expression was reduced by apocynin, tempol (10 μ mol/L), catalase (1000 U/mL) and lactacystin (5 μ mol/L). Moreover, H₂O₂ (50 μ mol/L, 90 min) induced COX-2 expression, which was reduced by lactacystin. Pioglitazone (10 μ mol/L) reduced the effects of interleukin-1 β on: 1) COX-2 protein and mRNA levels; 2) NOX-1 protein and mRNA levels, NADPH oxidase activity and ROS production; and 3) p-IKK, p65 expressions and cell proliferation. Pioglitazone also reduced the H₂O₂-induced-COX-2 expression and increased Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase protein expression. PPAR γ siRNA (5 nmol/L) further increased interleukin-1 β -induced COX-2 and NOX-1 mRNA levels. In addition, pioglitazone increased the interleukin-1 β -induced PPAR γ mRNA levels.

Conclusion: PPAR γ activation with pioglitazone reduces interleukin-1 β -induced COX-2 expression by interference with the redox-sensitive transcription factor NF- κ B.

Keywords: pioglitazone; COX-2; oxidative stress; NF- κ B; vascular smooth muscle cells.

List of non-standard abbreviations: ROS: reactive oxygen species; H₂O₂: hydrogen peroxide; O₂⁻: superoxide anion; COX: cyclooxygenase; VSMC: vascular smooth muscle cells; SHR: spontaneously hypertensive rats; PPARs: Peroxisome-proliferator activated receptors; IL-1 β : interleukin-1 β ; SOD: superoxide dismutase.

Introduction

Peroxisome-proliferator activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily that regulate gene expression [1-3]. Upon activation, PPARs heterodimerize with the retinoic X receptor (RXR), bind to specific PPAR response elements (PPRE) in the promoter region of their target genes and then activate gene expression [1-3]. Alternatively, PPAR also regulates gene expression in a DNA-independent fashion by interfering with other signalling pathways such as NF- κ B, AP-1 or STAT [2]; this mechanism, termed trans-repression, explains the anti-inflammatory properties of the PPAR-ligand complex. In addition, PPARs repress the transcription of direct target genes in the absence of ligands (*ligand-independent repression*) [2]. To date, three members have been identified, α , β/δ and γ , with different tissue distribution and ligand specificity. PPAR γ is mostly expressed in adipose tissue and it has been shown to play a major regulatory role in adipocyte differentiation [4] and glucose homeostasis [5]. Natural ligands for PPAR γ include free fatty acids and prostaglandin D₂ derivatives; synthetic agonists include thiazolidinediones (glitazones), which are insulin sensitizers used as antidiabetic type II. PPAR γ is also present in vascular cells, where its stimulation has been shown to have cardiovascular protective effects through regulation of cytokine production, adhesion molecule expression, fibrinolysis, modulation of monocyte-derived macrophages and fibrosis [1, 6]. In addition, PPAR γ agonists inhibit the expression of NADPH oxidase components, the main source of superoxide anion (O₂⁻) at vascular level, and the subsequent reactive oxygen species (ROS) production, thus contributing to the antiinflammatory effect of these drugs [7, 8].

Prostaglandins are important mediators of cardiovascular function. Although the constitutive isoform of cyclooxygenase (COX-1) is the rate-limiting enzyme in the formation of prostanoids in physiological conditions, these mediators can also be synthesized for the inducible isoform (COX-2). In most mammalian tissues, COX-2 expression remains undetectable under basal conditions although exposure to bacterial endotoxins, cytokines, hormones or growth factors induces its expression [9, 10]. Therefore, the role of COX-2 seems to be more important in pathological processes such as inflammation. COX-2 expression is highly regulated by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Several transcription factors, such as the redox-sensitive NF- κ B or AP-1, activated by cytokines and other inflammatory mediators, have been implicated in this regulation [11].

Hypertension is associated with increased plasma inflammatory markers such as cytokines [12, 13]. Among them, greater levels of the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β have been described in both plasma and aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) compared to their normotensive controls [14]. In addition, hypertension is also associated to augmented vascular COX-2 expression and COX-2-derived prostanoids [15-17] which may modify the regulation of vascular tone during this pathology. Increased oxidative stress has also been described in human and different models of hypertension, including SHR [13]. Interestingly, ROS production is associated to induction of COX-2 expression in several conditions [18-21]. Thus, induction of COX-2 by hydrogen peroxide (H₂O₂) or a superoxide-generating system has been described [18]. PPAR γ activation inhibits COX-2 expression [22-24] and ROS production [7, 8] and increases antioxidant mechanisms [7, 8]. Therefore, it might be possible that anti-inflammatory properties of PPAR γ agonists would be attributable, at

least in part, to the interference with the ROS-elicited COX-2 induction after cytokines exposure. To evaluate this hypothesis, we studied the effect of pioglitazone on COX-2 expression induced by IL-1 β in vascular smooth muscle cells (VSMC) from hypertensive rats and the role of the redox-sensitive transcription factor NF- κ B on this effect.

Methods

All experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of our Institution, according to the guidelines for ethical care of experimental animals of the European Community. The investigation conforms to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and the current Spanish and European laws (RD 223/88 MAPA and 609/86).

Cell cultures

VSMC isolated from aortas of 6-month-old SHR were used. Briefly, thoracic aortas were aseptically removed, cleaned of fat tissue and blood cells and placed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (4°C) containing 2 mg/mL type 2 collagenase (Invitrogen), 0.1% bovine seroalbumin (BSA), 200 U/mL of penicillin and 200 µg/mL of streptomycin (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA). After adventitia was carefully removed, VSMC were obtained by the explant method [21]. For experiments, cells from passages 3 to 8 were made quiescent by incubation in serum-free DMEM supplemented with 0.1% BSA for 24 h. Cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/mL) for 24 h with or without pretreatment for 18 h with the PPAR γ agonists pioglitazone, rosiglitazone or 15d-PGJ₂. The effects of apocynin, catalase, tempol or lactacystin were analyzed by its addition to the incubation medium 18 h before IL-1 β . In another set of experiments, the effects of H₂O₂ on COX-2 expression in the absence and presence of pioglitazone were also analyzed.

In some experiments, VSMC from 6 month-old normotensive (Wistar Kyoto) rats were also used. These cells were obtained similarly to those from hypertensive animals and used from passages 3 to 8.

Western blot analysis

Protein expression was determined in whole-cell lysates (20-25 μg protein) or nuclear extracts (15 μg protein) by western blot. Whole-cell extracts were prepared in RIPA buffer. Nuclear extracts were obtained by scrapping VSMC in hypotonic buffer (0.02 mol/L HEPES pH=8, 0.01 mol/L KCl, 0.15 mmol/L EDTA pH=8, 0.15 mmol/L EGTA pH=8 and protease and phosphatase inhibitor cocktails). After 5 min centrifugation at 5,000 rpm, the supernatant (cytosolic fraction) was removed and the pellet was resuspended in hypertonic buffer (0.02 mol/L HEPES pH=8, 0.450 mol/L NaCl, 25% glycerol, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 0.25 mmol/L EDTA pH=8, 0.15 mmol/L EGTA pH=8 and protease and phosphatase inhibitor cocktails), incubated for 30 min and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min, recovering the supernatant as nuclear fraction.

Proteins were separated by 7.5% for COX-2, 10% for p-IKK and p65 or 12% SDS-PAGE for SODs and NOX-1, and transferred to polyvinyl difluoride membranes overnight that were incubated with rabbit polyclonal antibodies for COX-2 (1:150; Cayman Chemical; Ann Arbor, MO, USA), Cu/Zn-SOD (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Stressgen Bioreagents Corp., Victoria, Canada), Mn-SOD (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Stressgen Bioreagents Corp.), EC-SOD (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Stressgen Bioreagents Corp.) and p65 (1:1,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) or goat polyclonal antibodies for NOX-1 (1:100 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc) and p-IKK (1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc). Immunoreactive bands were visualized using HRP-

conjugated antirabbit or antigoat IgG (1:2,000, Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) and ECL Plus Western blot analysis system (Amersham International, Little Chalfont, UK) and subjected to autoradiography (Hyperfilm ECL, Amersham International). Immunoblot signals were quantified using the Typhoon 9210 quantification software (Amersham Biosciences). The same membrane was used to determine α -actin (monoclonal antibody anti- α -actin, 1:150,000 dilution, Sigma Chemical Co) or IKK expressions (polyclonal antibody anti-IKK, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc) in cellular lysates or TBP expression in cytosolic and nuclear extracts (polyclonal antibody anti-TBP, 1:2,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology Inc).

Results are expressed as the ratio between signals on the immunoblot corresponding to the different proteins and α -actin or IKK for cellular lysates or TBP for nuclear extracts. To compare results for protein expression within the same experiment and with others, we assigned a value of 1 in each gel to the expression of control cells or cells stimulated with IL-1 β and used that value to calculate the relative density of other bands from the same gel.

Quantitative PCR real time (qRT-PCR) assay

The different mRNAs were determined in VSMC by qRT-PCR. Total RNA was obtained by using TRIzol (Invitrogen). A total of 1 μ g of DNase I-treated RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 20 μ L reaction. PCR was performed in duplicate for each sample using 0.5 μ L of cDNA as template, 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10x of Taqman Gene Expression Assays

(Applied Biosystems, COX-2: Rn00568225_m1; NOX-1: Rn00586652_m1; PPAR γ : Rn00440945_m1) in a 20 μ L reaction. For quantification, qRT-PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, from the CAT of Universidad Rey Juan Carlos) using the following conditions: 2 min 50°C, 10 min 95°C and 40 cycles: 15 s 95°C, 1 min 60°C. As a normalizing internal control we amplified β 2 microglobulin (Rn00560865_m1). To calculate the relative index of gene expression, we employed the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [25] using untreated samples as calibrator.

RNA Interference and Cell Transfection

A small interfering RNA (siRNA) against PPAR γ and siRNA with a nonsilencing oligonucleotide sequence (non-specific or siRNActrl) were obtained (Quiagen-Izasa, Barcelona, Spain). One day after cells were plated, the cultures were transfected with 5 nmol/L of both siRNA using "Hi-Perfect transfection Reagent" according to the manufacturer's instructions (Quiagen-Izasa). 24 h after transfection, cells were treated or not for 18 h with pioglitazone and stimulated for another 24 h period with IL-1 β . The silenced gene was monitored by qRT-PCR.

Detection of intracellular ROS production

Intracellular O $_2^{\cdot-}$ production was measured by fluorescence imaging analysis with dihydroethidium (DHE). Briefly, VSMC were plated onto glass coverslips inserted into 6-well plates and cultured as described above. Subconfluent cells were stimulated with IL-1 β for 24 h in the absence and presence of pioglitazone which was added 18 h before IL-1 β . Afterwards, cells were loaded with DHE (10 μ mol/L) in serum-free DMEM plus 0.1% BSA for 30 min at 37°C. Non-stimulated VSMC were daily imaged in parallel using the same image settings during the course of the study. Images were captured with

a fluorescent laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP5 equipped with a krypton/argon laser). The fluorescence intensity values of 10-15 nuclei/experiment were measured using the Metamorph image analysis software (Molecular Devices Corp., Downingtown, PA, USA).

The colorant 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was also used to estimate the intracellular ROS production, particularly H_2O_2 . VSMC were cultured into 24-wells plates at 50% of confluence and treated as described for $O_2^{\cdot-}$ detection. Afterwards, cells were loaded with 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA for 30 min in the darkness. VSMC were washed with phosphate-buffered saline and 500 μL of NaOH (1 mol/L) was added to the well, incubating the plate in continuous shaking for 30 min. Intracellular fluorescence was then quantified with a spectrofluorimeter (Spectrafluor Plus, Tecan Iberica, Barcelona, Spain) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. H_2O_2 (1 $\mu\text{mol/L}$) was used as positive control; the reduction of DCF by catalase (1000 U/mL) confirms the specificity of the method.

Changes in cellular fluorescence were determined by calculating the fluorescence intensity values in the presence of IL-1 β or IL-1 β plus pioglitazone.

NADPH oxidase activity

Cells were treated as described for $O_2^{\cdot-}$ detection and NADPH oxidase activity was determined using the method described by San José et al. [26], with minor modifications. The $O_2^{\cdot-}$ production was determined by a chemiluminescence assay using lucigenin (5 $\mu\text{mol/L}$) and NADPH (100 $\mu\text{mol/L}$). The reaction was started by the addition of a mixture of lucigenin and NADPH to the protein sample in a final volume of 300 μL . Chemiluminescence was determined every 2.4 seconds for 5 min in a

Berthold tube luminometer (Berthold Detection System, Sirius, Pforzheim, Germany). A buffer blank was subtracted from each reading and the value of the area under the curve was used to quantify chemiluminescence. Data are expressed as counts per second (count/s).

Proliferation assay

For proliferation assays, cells were seeded in 24-well plates at a density of 2.5×10^4 cells/well. After 24 h, cells were starved for additional 24 h in DMEM supplemented with 0.1% BSA. Cells were stimulated with IL-1 β (10 ng/mL) for 24 h with or without 18 h pretreatment with pioglitazone and apocynin or 1 h pretreatment with lactacystin. Cells grown in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h were used as positive control. After this period, cells were washed with PBS, fixed with 1% glutaraldehyde for 10 min and stained for 30 min with 1% crystal violet dissolved in 10% ethanol. After washing and drying, crystal violet was extracted with 10% acetic acid. Absorbance was measured with a spectrofluorimeter (Spectrafluor Plus) using an excitation wavelength of 595nm (Abs_{595}). Data are expressed as relative Abs_{595} values obtained in control starved cells.

Statistical analysis and drugs

Results are expressed as mean \pm SEM. *n* denotes the number of different cultures used for the experiments. Each culture is obtained from three different animals. Statistical analysis was done by using paired Student's *t* test or one-way ANOVA followed by Bonferroni test. Values were considered to be significant when $P < 0.05$.

IL-1 β , H₂O₂, DCFH-DA, lactacystin, rosiglitazone, lucigenin, NADPH, catalase and crystal violet were obtained from Sigma Chemical, Co, apocynin and tempol from

Fluka-Sigma Chemical (Seelze, Germany), DHE from Molecular Probes™, Invitrogen and 15d-PGJ₂ from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Pioglitazone was generously supplied by Lilly Spain.

Results

IL-1 β -induced COX-2 expression is dependent of ROS production

Treatment of VSMC from SHR with IL-1 β (10 ng/mL, 2-24 h) time-dependently increased COX-2 protein expression (Fig. 1a). At 24 h, IL-1 β increased both COX-2 protein (Fig. 1b) and mRNA levels (Fig. 1c). In VSMC from WKY, IL-1 β also increased COX-2 expression; however, this increase was lower to that found in SHR both for mRNA (relative expression *vs* control, WKY: 1.18 ± 0.07 , $n=11$; SHR: 1.54 ± 0.13 , $n=16$, $P<0.05$) and for protein expression (relative expression *vs* control, WKY: 1.52 ± 0.34 , $n=7$; SHR: 3.79 ± 0.69 , $n=16$, $P<0.05$).

In VSMC from SHR, IL-1 β also increased protein expression and mRNA levels of the NOX-1 subunit of NADPH oxidase (Fig. 2a) as well as the NADPH oxidase-dependent O₂⁻ production (Fig. 2b); in agreement, DHE staining and DCF fluorescence demonstrated that IL-1 β significantly increases ROS generation in this strain (Fig. 2c and 2d); in VSMC from WKY, IL-1 β did not modify ROS production (relative increases in DCF fluorescence intensity SHR: 2.67 ± 0.45 , $n=7$; WKY: 1.04 ± 0.04 , $n=17$, $P<0.05$). DCF fluorescence in SHR was reduced by the NADPH oxidase inhibitor apocynin (30 μ mol/L, Fig. 2d).

Since oxidative stress induced by IL-1 β was greater in cells from SHR than WKY, we next focused on the effects of ROS scavengers and PPAR γ agonists on the IL-1 β -induced COX-2 expression in cells from SHR. The levels of both COX-2 protein and mRNA induced by IL-1 β were reduced by apocynin and catalase (1000 U/mL) (Fig. 2e). The SOD mimetic tempol (10 μ mol/L) also reduced IL-1 β -induced COX-2 protein

expression (relative COX-2 expression 0.59 ± 0.11 , $n=5$, $P<0.05$). Furthermore, its combination with catalase did not further reduce COX-2 expression (relative COX-2 expression 0.43 ± 0.19 , $n=5$, $P>0.05$). All together these results suggest that ROS participate in COX-2 expression induced by IL-1 β in VSMC from SHR. In addition, H₂O₂ (1-50 μ mol/L, 90 min) concentration-dependently increased COX-2 protein (Fig. 2f). H₂O₂ (50 μ mol/L) also increased COX-2 mRNA levels (Fig. 2g); the H₂O₂-induced COX-2 expression was abolished with catalase (1000 U/mL, results not shown).

PPAR γ activation downregulates IL-1 β -induced COX-2 expression by interfering with ROS production

Pretreatment of VSMC for 18 h with the PPAR γ agonists pioglitazone (1-30 μ mol/L), rosiglitazone (1-30 μ mol/L) and 15d-PGJ₂ (0.1-10 μ mol/L) concentration-dependently reduced IL-1 β -induced COX-2 protein expression (Fig. 3a). Pioglitazone (10 μ mol/L) also reduced the IL-1 β -induced COX-2 mRNA levels (Fig. 3b). Besides the effect on COX-2, pioglitazone further increased the PPAR γ mRNA levels induced by IL-1 β (Fig. 3c). To further confirm the association between PPAR γ and COX-2, VSMC were treated with a specific siRNA against PPAR γ . The siRNA treatment successfully downregulated the PPAR γ mRNA expression (Fig. 3d), while the non-specific siRNA did affect neither PPAR γ (0.91 ± 0.20 , $n=6$, $P>0.05$) nor COX-2 expression (1.04 ± 0.23 , $n=6$, $P>0.05$). After siRNA treatment, there was a significant increase in COX-2 mRNA (Fig. 3e). Pioglitazone also increased IL-1 β -induced PPAR γ mRNA levels after siRNA treatment (Fig. 3d), while the COX-2 mRNA levels were similar to those observed in the presence of IL-1 β alone but lower than levels observed by IL-1 β after

PPAR γ siRNA (Fig. 3e). All together, these results suggest that PPAR γ activation downregulates IL-1 β -induced COX-2 expression.

Treatment of cells with pioglitazone also reduced the increased IL-1 β -induced NOX-1 protein expression and mRNA levels (Fig. 4a), the NADPH oxidase activity (Fig. 4b) and the subsequent ROS production (Fig. 4c and 4d). Moreover, after PPAR γ siRNA transfection, NOX-1 mRNA levels were increased (Fig. 4e). These results suggest that PPAR γ activation decreases ROS production by mechanisms dependent of NADPH oxidase regulation and this mechanism may contribute to the reduction of COX-2 expression. In addition, pioglitazone also reduced COX-2 expression induced by 50 μ mol/L H₂O₂ (Fig. 4f).

We also analyzed the possible effect of PPAR γ agonists on antioxidant defences. IL-1 β increased Cu/Zn-, Mn- and EC-SOD protein expression. Pioglitazone further increased Cu/Zn- and Mn-SOD protein expression observed in the presence of IL-1 β , but did not modify the EC-SOD expression (Fig. 5).

The effect of pioglitazone on IL-1 β -induced COX-2 expression is mediated by interference with NF- κ B

Pretreatment with the proteasome inhibitor lactacystin (5 μ mol/L) prevented either IL-1 β - (Fig. 6a) or H₂O₂-induced COX-2 expression (relative H₂O₂-induced COX-2 protein expression in the presence of lactacystin: 0.72 ± 0.07 , $n=9$; $P<0.05$). On the other hand, IL-1 β increased the nuclear expression of the p65 NF- κ B subunit; this effect was prevented by apocynin and pioglitazone (Fig. 6b); the combination of apocynin plus pioglitazone induced a similar effect to that apocynin alone (apocynin: 0.86 ± 0.02 , $n=4$;

apocynin plus pioglitazone: 0.86 ± 0.09 , $n=4$, $P>0.05$). IL-1 β also increased p-IKK expression; both apocynin and pioglitazone reduced this effect (Fig. 6c). These results suggest that IL-1 β induces NF- κ B activation through ROS. This NF- κ B activation in turn, participates in IL-1 β -induced COX-2 expression. In addition, pioglitazone inhibits IL-1 β -induced COX-2 expression by interfering with the NF- κ B activation.

Since alterations in NF- κ B activation are often related to changes in the cell proliferation rate, we aimed to determine whether the inhibitory effect of pioglitazone on ROS production and NF- κ B activation observed after IL-1 β exposure could be related with changes in VSMC proliferation. In our experimental settings, IL-1 β increased VSMC proliferation ($Abs_{595}=1.89 \pm 0.30$, $n=4$; $P<0.05$), and the treatments with lactacystin ($Abs_{595}=1.09 \pm 0.39$, $n=4$; $P<0.05$), pioglitazone ($Abs_{595}=1.33 \pm 0.23$, $n=4$; $P<0.05$) and apocynin ($Abs_{595}=0.97 \pm 0.17$, $n=4$; $P<0.05$) prevented that increase. These results suggest that NF- κ B, likely activated by ROS, contributes to IL-1 β -induced cell proliferation and that pioglitazone interferes with these mechanisms.

Discussion

The major finding of the present study was that the cytokine IL-1 β induces COX-2 expression in VSMC from hypertensive rats by ROS generation and that the PPAR γ agonist pioglitazone reduces this expression by interfering with the redox-sensitive transcription factor NF- κ B. These findings provide new insights into the mechanisms involved in the anti-inflammatory and cardioprotective effects of PPAR γ agonists.

COX catalyzes the rate-limiting step in the formation of prostanoids, important mediators of the inflammatory response. In healthy blood vessels, most prostanoids are formed by COX-1; however, these mediators may also be synthesized by COX-2 after exposure to inflammatory agents such as lipopolysaccharide or cytokines [9, 10]. COX-2 is increased in pathological conditions involving inflammatory processes such as hypertension [15-17]. Hypertension is associated with elevated levels of circulating proinflammatory cytokines [12-14], which may modify the regulation of vascular tone during this pathology. IL-1 β is a key player in the local and systemic inflammatory response. In VSMC from hypertensive rats, IL-1 β treatment increased COX-2 expression at both protein and mRNA levels, as shown by other authors in different tissues [27, 28]. This increase was greater in cells from hypertensive than normotensive rats. COX-2 activation by proinflammatory cytokines would contribute to the inflammatory process and to the vascular alterations found in hypertension. Thus, we and others have described that the increased COX-2 expression observed in vessels from hypertensive rats is responsible for the increased contractile prostanoid production and its participation in vasoconstrictor responses as well as for the endothelial dysfunction described in hypertensive or aged animals [15, 29].

Hypertension has also been associated to increased oxidative stress [13]. In several cell types, including vascular cells, it has been described that $O_2^{\cdot-}$ or H_2O_2 might be involved in IL-1 β signalling [30]. The source of ROS varies between different cell types, being NADPH oxidase the most probable in vascular cells [31, 32]. In our experimental conditions, IL-1 β increased the NADPH oxidase activity, induced the expression of the NOX-1 subunit of NADPH oxidase and increased the $O_2^{\cdot-}$ production in VSMC from SHR. In addition, only in cells from hypertensive animals, an augmented production of H_2O_2 , sensitive to apocynin, was observed after IL-1 β treatment. Similar results have been obtained in cat lower esophageal sphincter circular muscle [20], and suggest a role of NADPH oxidase in the formation of H_2O_2 . However, although NADPH oxidase can produce H_2O_2 as its initial product [33], most H_2O_2 is derived from dismutation of $O_2^{\cdot-}$ by SODs.

Oxidative stress has been reported to induce the expression and activation of COX-2. Thus, a relationship between COX-2 expression and NADPH oxidase activity has been suggested after exposure to several stimuli [19-21]. Herein, we demonstrate in VSMC from hypertensive rats that IL-1 β -induced COX-2 expression is mediated, at least partially, by ROS generation. This is supported by the following results: 1) as mentioned, IL-1 β increased NOX-1 expression, NADPH oxidase activity and intracellular $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production; 2) the NADPH inhibitor apocynin, the SOD mimetic tempol, the H_2O_2 scavenger catalase and its combination with tempol reduced IL-1 β -induced COX-2 expression; and 3) exogenously added, H_2O_2 induced COX-2 expression. Recently, it has been described that apocynin reduces ROS availability through its antioxidant properties independent of its ability to inhibit NADPH oxidase

[34]. Of interest, we found that ROS are involved in the IL-1 β -induced COX-2 expression in cells from SHR, although we do not know the exact mechanism of apocynin in our experimental model.

PPAR γ regulates a variety of physiological processes, including adipogenesis and glucose metabolism [4, 5]. In addition, several studies have demonstrated that PPAR γ ligands suppress inflammatory gene expression. This effect may not involve direct DNA binding, but interaction with transcription factors such as the redox-sensitive transcription factors AP-1 and NF- κ B [2, 35], some of them being necessary for COX-2 transcription [11]. It has been widely shown that PPAR γ agonists reduce the increased COX-2 in several inflammatory models [22-24, 36, 37], although in some conditions increased COX-2 expression has also been described [38, 39]. In VSMC from SHR we found that pioglitazone as well as rosiglitazone and 15d-PGJ₂ reduced the increased IL-1 β -induced COX-2 expression. Furthermore, specific downregulation of PPAR γ by siRNA increased COX-2 mRNA levels, suggesting that PPAR γ interferes with COX-2 expression. In addition, pioglitazone further increased the expression of PPAR γ induced by IL-1 β , even after siRNA treatment. These results would explain why COX-2 levels were also reduced by pioglitazone after PPAR γ siRNA treatment. Other investigators have also found increased PPAR γ expression using rosiglitazone and pioglitazone [40, 41] and suggest that the upregulated PPAR γ may contribute to the anti-inflammatory properties of glitazones and then contribute to the reduction of COX-2 expression.

It has been suggested that PPAR γ agonists inhibit oxidative stress and this effect might participate in the cardioprotective effect of these compounds [1]. Thus, PPAR γ ligands reduce the vascular NADPH oxidase expression and O₂⁻ production [7, 8]. We observed

that pioglitazone decreased the IL-1 β -induced NOX-1 expression and NADPH oxidase activity as well as the intracellular ROS production, confirming that PPAR γ agonists decrease oxidative stress in VSMC from SHR. The fact that PPAR γ siRNA increased IL-1 β -induced NOX-1 expression further corroborates this possibility. Our results are in agreement with reports showing that rosiglitazone decreased NADPH oxidase activity in hypertension models [42, 43] and that pioglitazone protected against hypertensive cardiovascular damage by reducing ROS production [44].

Reduction of oxidative stress by PPAR γ ligands is also associated with increases in antioxidant defences; thus, augmented expression and/or activity of SOD has been described [7, 8, 43]. We observed increased expression of Cu/Zn-, Mn- and EC-SOD after IL-1 β , probably as a compensatory mechanism. Other authors have also described the ability of proinflammatory stimuli to increase antioxidant mechanisms [45, 46]. In addition to the reduction of IL-1 β -induced intracellular ROS production, pioglitazone further increased protein expression of both intracellular Cu/Zn- and Mn-SOD, but not of extracellular SOD. The induction of SODs by pioglitazone would increase the dismutation of O $_2^{\cdot-}$ to generate H $_2$ O $_2$, which contributes to the IL-1 β -induced COX-2 expression. However, pioglitazone treatment also reduced the increased O $_2^{\cdot-}$ and H $_2$ O $_2$ production induced by IL-1 β , probably by downregulating NADPH oxidase, thus confirming its antioxidant properties. Furthermore, pioglitazone also reversed the increased expression of COX-2 induced by exogenous H $_2$ O $_2$.

NF- κ B is a ubiquitous family of transcription factors controlling cell proliferation and migration [47] as well as the expression of genes involved in inflammatory response, such as COX-2 [11]. NF- κ B consists of dimers composed of the p65 and the p50 or p52

subunits. In resting cells, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm by association with its inhibitory proteins I κ Bs. After stimulation, the I κ B kinase (IKK) complex is activated and phosphorylates I κ B, which is then ubiquitinated and degraded by the proteasome, leading NF- κ B to be translocated into the nucleus and to exert its function as transcription factor. To analyze the involvement of NF- κ B in IL-1 β -induced COX-2 expression, we used lactacystin, a natural non peptidic proteasome inhibitor commonly employed to analyze the involvement of NF- κ B pathway. Lactacystin inhibits 26S proteasome activity by covalently binding to the threonine placed in the N-terminal part of its proteolytic subunit; this avoids I κ B degradation and, in last term, retains NF- κ B heterodimer in the cytoplasm [48, 49]. The induction of COX-2 by both IL-1 β and H₂O₂ was prevented by lactacystin, suggesting that COX-2 induction by cytokines and/or oxidative stress is dependent of the NF- κ B pathway activation. Accordingly, IL-1 β increased the nuclear expression of p65 NF- κ B subunit and the expression of p-IKK, effects which were prevented by apocynin and pioglitazone treatment. IL-1 β -induced NF- κ B activation had a functional role since proliferation rate induced by IL-1 β was prevented by NF- κ B and ROS blockade in VSMC from SHR. In addition, PPAR γ activation also prevented IL-1 β -induced cell proliferation, in agreement to that found by Zhang et al. [50]. Other authors have suggested that H₂O₂, by NF- κ B translocation to the nucleus, causes upregulation and increased COX-2 protein expression and activation [51]. Then, the reduction of H₂O₂-induced COX-2 expression by pioglitazone would be explained by trans-repression mechanisms interfering with the NF- κ B signalling pathway.

In conclusion, the present study shows that PPAR γ activation with pioglitazone reduced IL-1 β -induced cell proliferation as well as COX-2 expression. The proposed mechanisms involved in this inhibitory effect would be the following: 1) inhibition of NOX-1 expression and consequent reduced production of both O $_2^{\cdot-}$ and H $_2$ O $_2$; 2) interference with the effect of ROS on COX-2 expression; 3) increase in the detoxificant enzymes SODs; 4) decrease in the NF- κ B redox-sensitive activity induced by IL-1 β . Of interest, pioglitazone also increases the IL-1 β -induced PPAR γ expression, which would contribute to the anti-inflammatory properties of this glitazone and to the reduction of COX-2. The interference of NF- κ B activity and the subsequent COX-2 expression reduction by pioglitazone, would contribute to the cardioprotective effect of PPAR γ agonists in inflammatory processes such as described in the hypertensive pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. Amada E. Beltran and Marta Miguel for her help with some of the experiments.

REFERENCES

1. Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 2006; **45**:19-28.
2. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1771**:926-935.
3. Takano H, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cardiovascular diseases. *Circ J* 2009; **73**:214-220
4. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; **79**:1147-1156.
5. Leff T, Mathews ST, Camp HS. Review: peroxisome proliferator-activated receptor- γ and its role in the development and treatment of diabetes. *Exp Diabetes Res* 2004; **5**:99-109.
6. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; **18**:128-133.
7. Inoue I, Goto S, Matsunaga T, Nakajima T, Awata T, Hokari S, *et al.* The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and PPAR γ increase Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism* 2001; **50**:3-11.
8. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; **288**:C899-C905.

9. Vagnoni KE, Christiansen ND, Holyoak GR, Janowiak MA, Martin PH. Cellular source in ewes of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in uterine arteries following stimulation with lipopolysaccharide. *Biol Reprod* 1999; **61**:563-568.
10. Briones AM, Salaices M, Vila E. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1 β exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**:710-721.
11. Klein T, Shephard P, Kleinert H, Kömhoff M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773**:1605-1618.
12. Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; **2**:582-593.
13. Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am* 2009; **93**:621-635.
14. Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, *et al.* Effect of AT₁ receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF- κ B/I κ B system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288**:H1111-H1115.
15. Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* 2005; **23**:767-777.
16. Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, *et al.* Cyclooxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens* 2005; **23**:1025-1036.

17. Viridis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, *et al.* Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension* 2009; **53**:1008-1016.
18. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995; **95**:1669-1675.
19. Peng T, Lu X, Feng Q. NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. *FASEB J* 2005; **19**:293-295.
20. Cao W, Cheng L, Behar J, Biancani P, Harnett KM. IL-1 β signaling in cat lower esophageal sphincter circular muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **291**:G672-G680.
21. Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, *et al.* Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **321**:381-388.
22. Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Gouze E, Bécuwe P, *et al.* PPAR- γ ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**:C125-C133.
23. Mendez M, LaPointe MC. PPAR γ inhibition of cyclooxygenase-2, PGE₂ synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension* 2003; **42**:844-850.

24. Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 2005; **69**:1733-1744.
25. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001; **25**:402-408.
26. San José G, Bidegain J, Robador PA, Díez J, Fortuño A, Zalba G. Insulin-induced NADPH oxidase activation promotes proliferation and matrix metalloproteinase activation in monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med* 2009; **46**:1058-1067.
27. Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA. Temporal control of NF- κ B activation by ERK differentially regulates interleukin-1 β -induced gene expression. *J Biol Chem* 2004; **279**:1323-1329.
28. Machida T, Hiramatsu M, Hamaue N, Minami M, Hirafuji M. Docosahexaenoic acid enhances cyclooxygenase-2 induction by facilitating p44/42, but not p38, mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci* 2005; **99**:113-116.
29. Féléto M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol* 2011; **164**:894-912.
30. Brigelius-Flohé R, Banning A, Kny M, Bösl GF. Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch Biochem Biophys* 2004; **423**:66-73.
31. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004; **22**:339-352.
32. Brandes RP, Schröder K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends Cardiovasc Med* 2008; **18**:15-19.

33. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 2008; **45**:1340-1351.
34. Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, *et al.* Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 2008; **51**:211-217.
35. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; **391**:79-82.
- 36 Maggi LB Jr, Sadeghi H, Weigand C, Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA. Anti-inflammatory actions of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes* 2000; **49**:346-355.
37. Kapoor M, Kojima F, Qian M, Yang L, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deficiency is associated with elevated peroxisome proliferator-activated receptor: regulation by prostaglandin E₂ via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway. *J Biol Chem* 2007; **282**:5356-5366.
38. Bishop-Bailey D, Warner TD. PPAR γ ligands induce prostaglandin production in vascular smooth muscle cells: indomethacin acts as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. *FASEB J* 2003; **17**:1925-1927.
39. Kang YJ, Kim HS, Choi HC. Troglitazone increases IL-1 β induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression via enhanced phosphorylation of

- I κ B α in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2008; **31**:1955-1958.
40. Sommer M, Wolf G. Rosiglitazone increases PPAR γ in renal tubular epithelial cells and protects against damage by hydrogen peroxide. *Am J Nephrol* 2007; **27**:425-434.
41. Lee TI, Kao YH, Chen YC, Chen YJ. Proinflammatory cytokine and ligands modulate cardiac peroxisome proliferator-activated receptors. *Eur J Clin Invest* 2009; **39**:23-30.
42. Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; **23**:45-51.
43. Potenza MA, Gagliardi S, De Benedictis L, Zigrino A, Tiravanti E, Colantuono G, *et al.* Treatment of spontaneously hypertensive rats (SHR) with rosiglitazone ameliorates cardiovascular pathophysiology via anti-oxidant mechanisms in the vasculature. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **297**:E685-E694.
44. Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, *et al.* Beneficial effects of pioglitazone on hypertensive cardiovascular injury are enhanced by combination with candesartan. *Hypertension* 2008; **51**:296-301.
45. Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salices M. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **287**:H225-H234.

46. Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, *et al.* Modulation of interleukin-1 β mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull* 2007; **73**:55-63.
47. Wu JT, Kral JG .The NF- κ B/I κ B signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 2005; **123**:158-169.
48. Gasparian AV, Guryanova OA, Chebotaev DV, Shishkin AA, Yemelyanov AY, Budunova IV. Targeting transcription factor NF κ B: comparative analysis of proteasome and IKK inhibitors. *Cell Cycle* 2009; **8**:1559-1566.
49. Tsukamoto S, Yokosawa H. Targeting the proteasome pathway. *Expert Opin Ther Targets* 2009; **13**:605-621.
50. Zhang L, Xie P, Wang J, Yang Q, Fang C, Zhou S, Li J. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J Biol Chem* 2010; **285**:13666-13677.
51. Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E₂ through enhancement of NF- κ B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. *J Immunol* 2005; **175**:5423-5429.

Figure legends

Fig. 1. (a) Representative blot showing the effect of IL-1 β (10 ng/mL; 2-24 h) on COX-2 protein expression. (b) COX-2 protein expression and (c) mRNA levels in rat aortic VSMC untreated (control) or treated with IL-1 β (24 h). Results are expressed as relative expression of protein or mRNA compared to control. * $P < 0.05$. $n = 16$ to 30.

Fig. 2. (a) Effect of IL-1 β (10 ng/mL; 24 h) on NOX-1 protein expression (upper panel) and mRNA levels (lower panel); results are expressed as relative mRNA levels compared to control. (b) Effect of IL-1 β on NADPH oxidase-dependent O₂⁻ production evaluated by chemiluminescence. (c) Representative fluorescent photomicrographs (upper panels) and quantitative analysis (lower panel) of confocal microscopic sections of VSMC of IL-1 β effect on O₂⁻ production. Image size 375x375 μ m. Images were captured with a fluorescence confocal microscope x40 oil immersion objective, zoom 1. (d) Quantitative analysis of H₂O₂ production in cells untreated (control) and treated with IL-1 β in the absence and presence of apocynin (APO, 30 μ mol/L). Results of fluorescence are expressed as increases in intensity above the control value. (e) Effect of APO and catalase (CAT, 1000 U/mL) on IL-1 β -induced COX-2 protein expression (upper panel) and mRNA levels (lower panel). (f) Representative blot of the effect of H₂O₂ (1-50 μ mol/L; 90 min) on COX-2 protein expression. (g) Effect of H₂O₂ (50 μ mol/L, 90 min) on COX-2 mRNA levels; results are expressed as relative mRNA levels compared to control. * P <0.05 vs control, ⁺ P <0.05 vs IL-1 β . n =4 to 14.

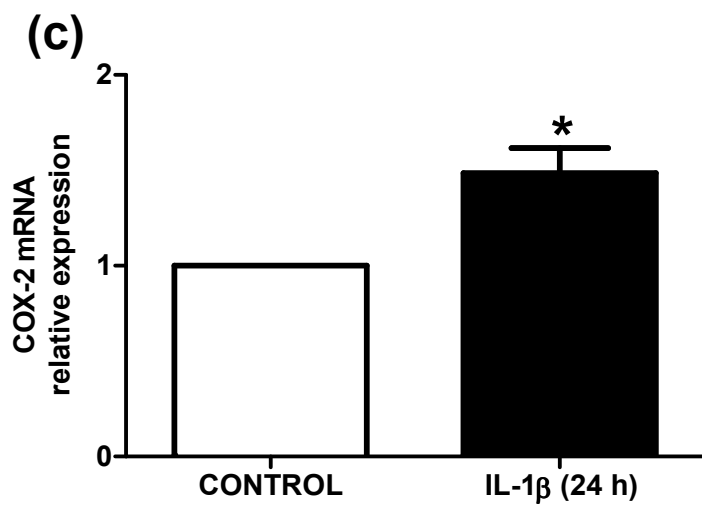
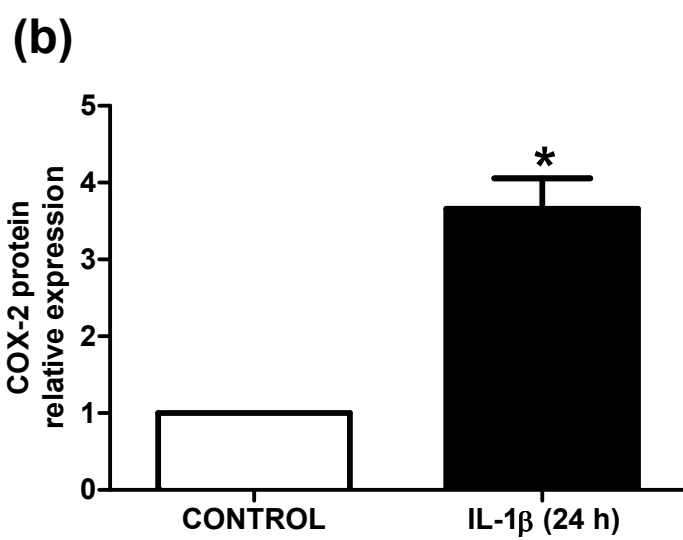
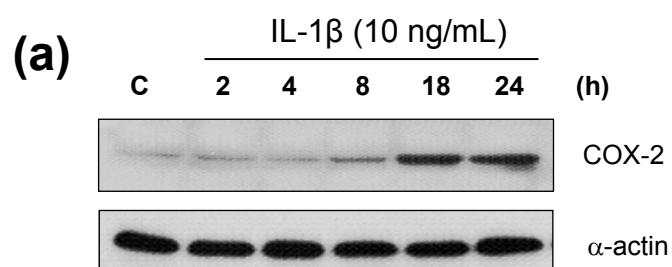
Fig. 3. (a) Representative blots showing the effect of 18 h treatment with pioglitazone (1-30 $\mu\text{mol/L}$), rosiglitazone (1-30 $\mu\text{mol/L}$) and 15d-PGJ₂ (0.1-10 $\mu\text{mol/L}$) on COX-2 protein expression induced by IL-1 β (10 ng/mL; 24 h) in VSMC from SHR. (b) Quantitative RT-PCR assessment of the effect of pioglitazone (PIO, 10 $\mu\text{mol/L}$) on the IL-1 β -induced COX-2 mRNA levels. (c) Effect of IL-1 β on the PPAR γ mRNA levels in the absence and presence of PIO; results are expressed as relative mRNA levels compared to control. Effect of PPAR γ siRNA (5 nmol/L) in the absence and presence of PIO on PPAR γ (d) and COX-2 (e) mRNA levels after IL-1 β in VSMC; results are expressed as the relative expression of mRNA compared to IL-1 β . * P <0.05 vs control, ⁺ P <0.05 vs IL-1 β , # P <0.05 vs siRNA. n =3 to 17.

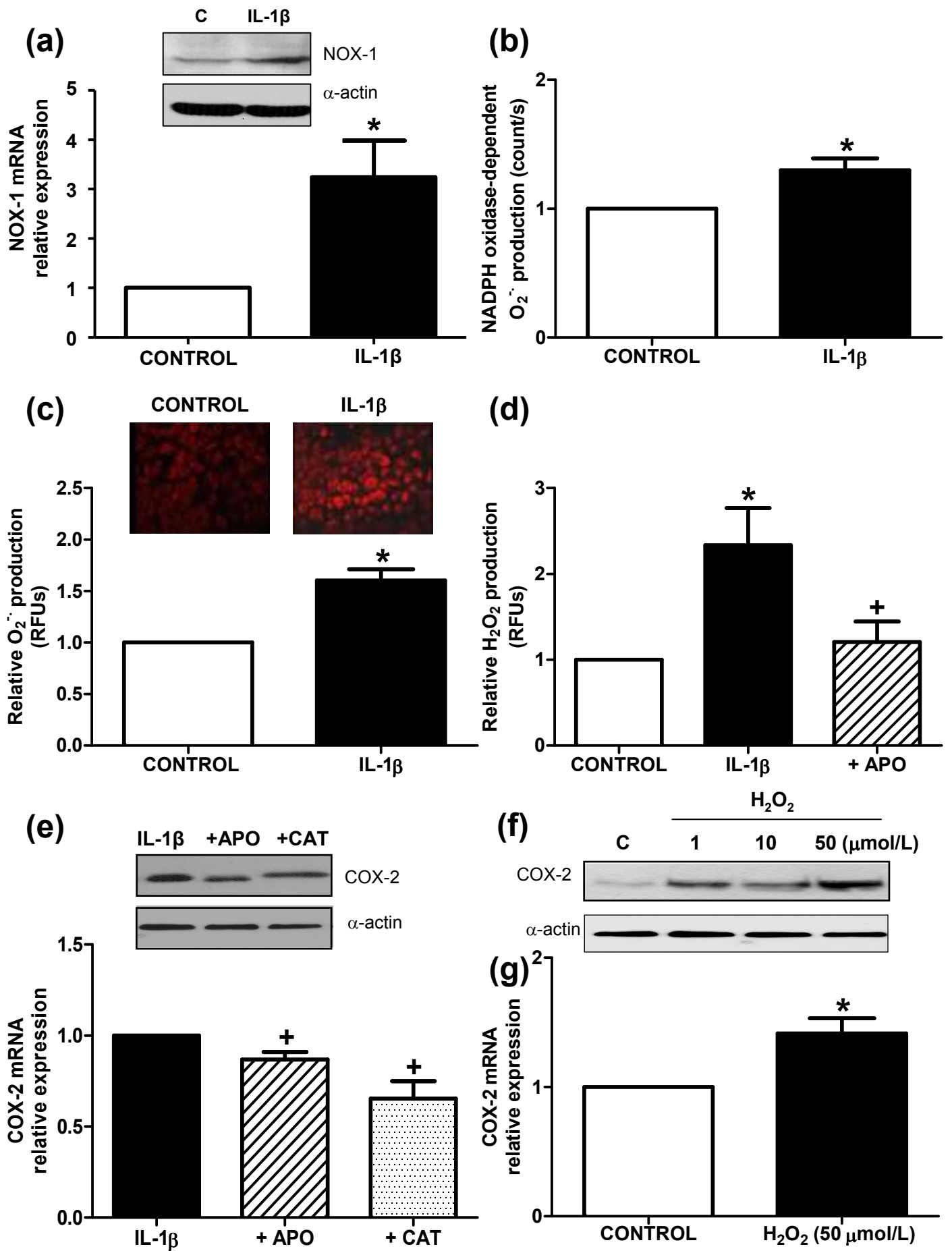
Fig. 4. (a) Effect of pioglitazone (PIO, 10 $\mu\text{mol/L}$) on NOX-1 protein expression (upper panel) and mRNA levels (lower panel) induced by IL-1 β (10 ng/mL; 24 h); results are expressed as relative mRNA levels compared to IL-1 β . (b) Effect of PIO on IL-1 β -induced NADPH oxidase-dependent O_2^- production evaluated by chemiluminescence. (c) Representative fluorescent photomicrographs (upper panels) and quantitative analysis (lower panel) of confocal microscopic sections of VSMC of PIO effect on the IL-1 β -induced O_2^- production. (d) Effect of PIO on IL-1 β -induced H_2O_2 production. Results are expressed as fluorescence intensity with respect to IL-1 β . (e) Effect of PPAR γ siRNA (5 nmol/L) on IL-1 β -induced NOX-1 mRNA levels; results are expressed as relative mRNA levels compared to IL-1 β . (f) Representative western blot and densitometric analysis of the effect of PIO on COX-2 protein expression induced by H_2O_2 (50 $\mu\text{mol/L}$, 90 min). Results are expressed as protein expression compared to H_2O_2 . * $P < 0.05$. $n = 3$ to 8.

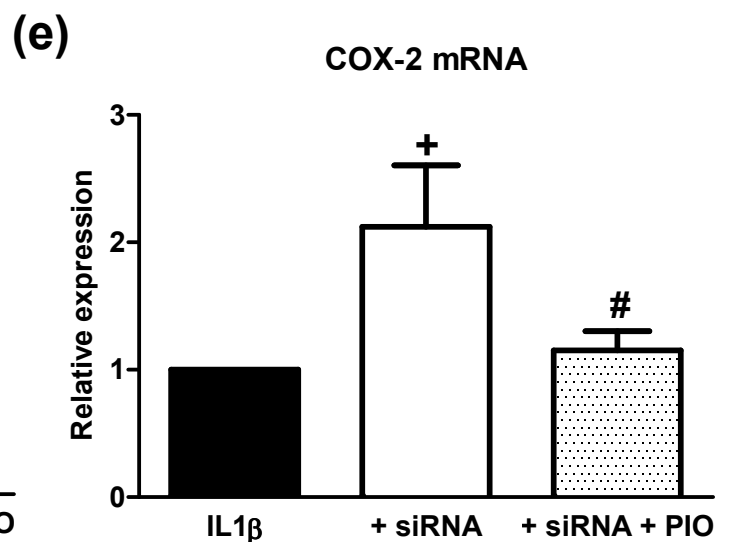
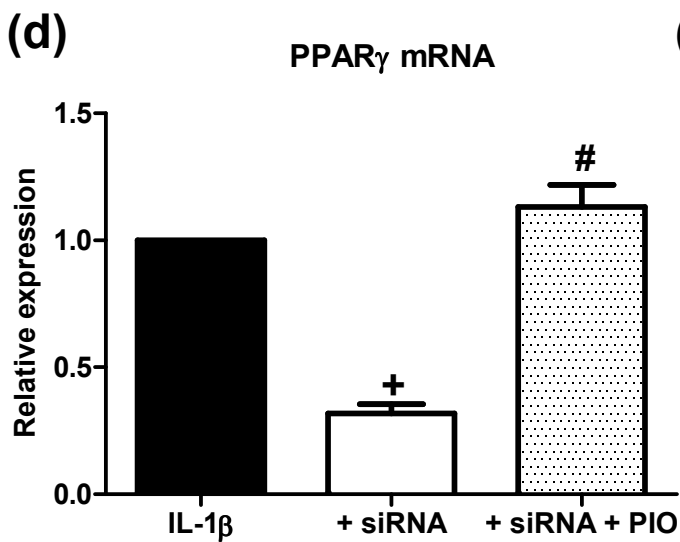
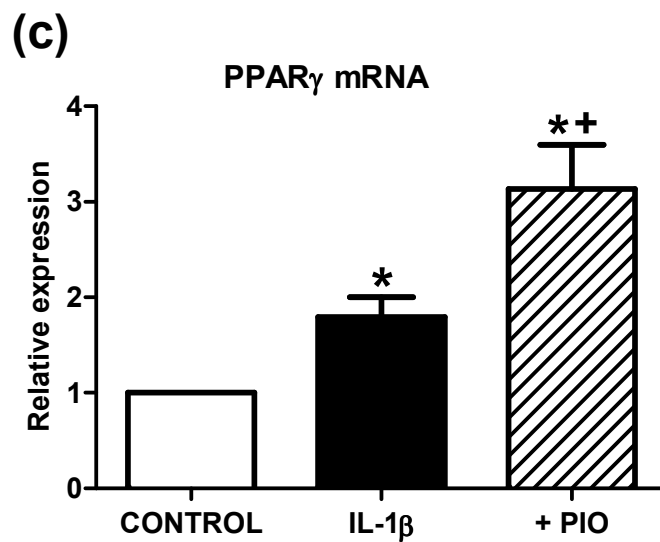
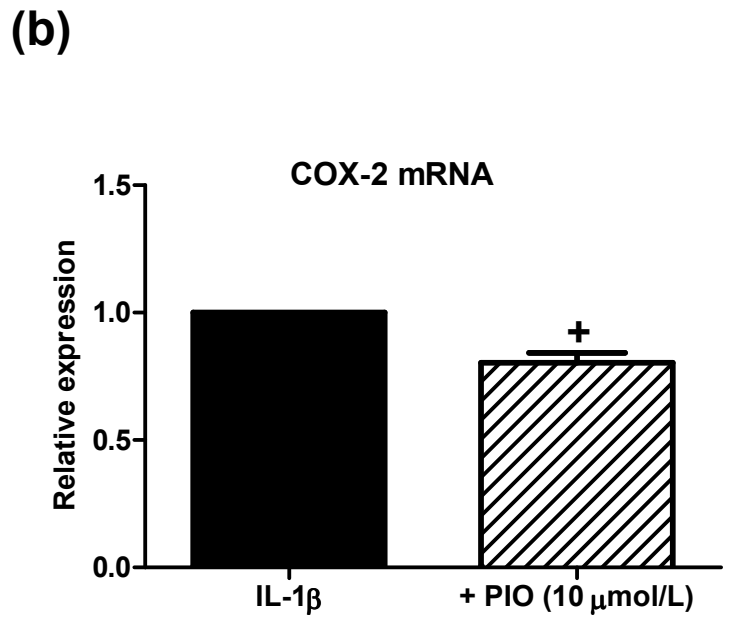
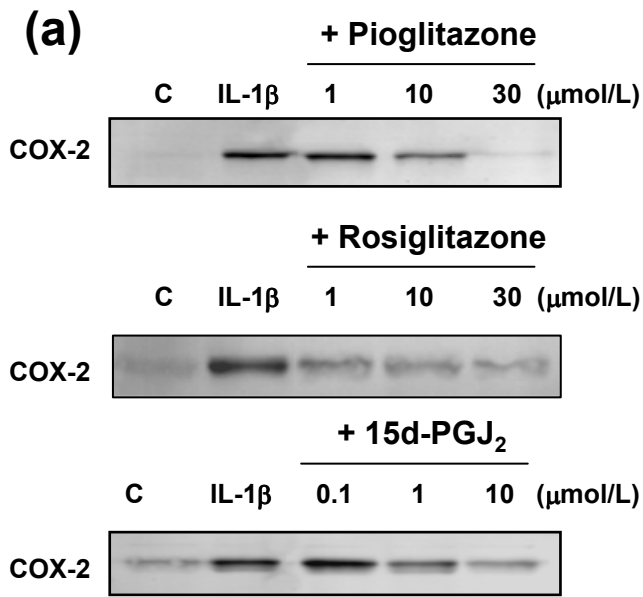
Fig. 5. Effect of pioglitazone (PIO, 10 $\mu\text{mol/L}$) on (a) Cu/Zn-, (b) Mn- and (c) EC-SOD protein expression induced by IL-1 β (10 ng/mL; 24 h) in VSMC. Representative blots are shown above. Results are expressed as relative expression compared to control.

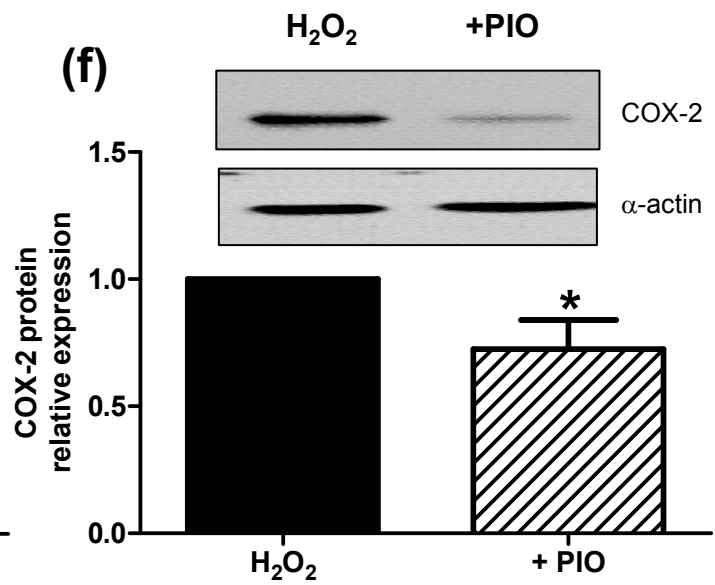
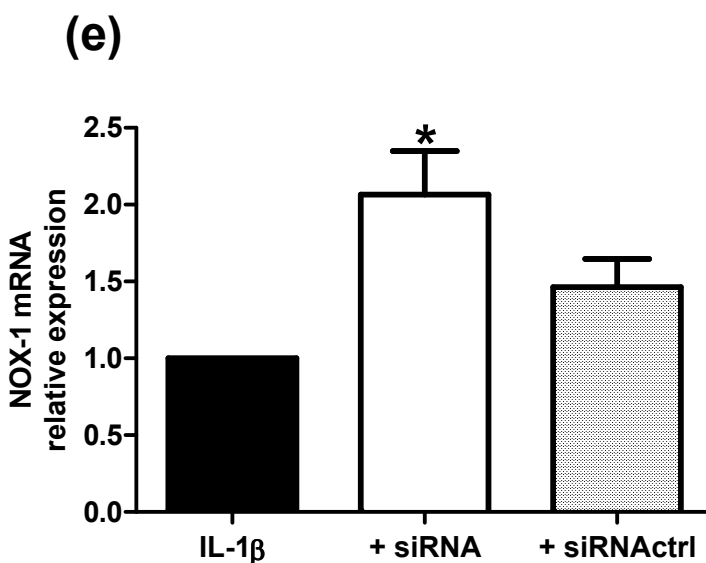
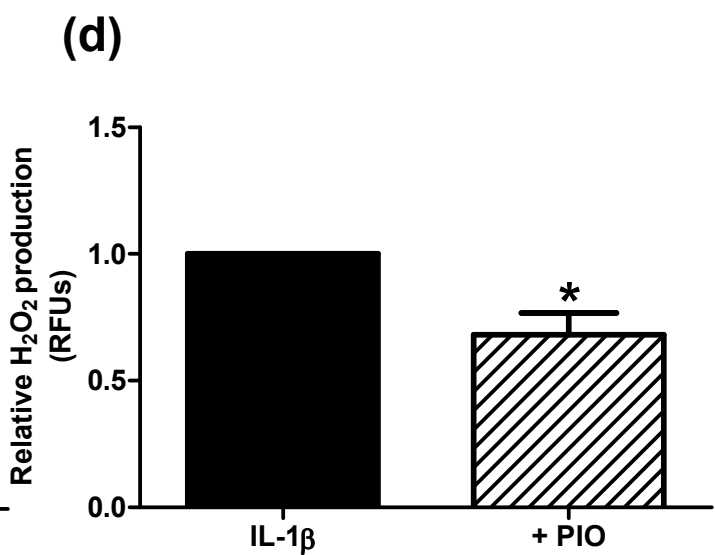
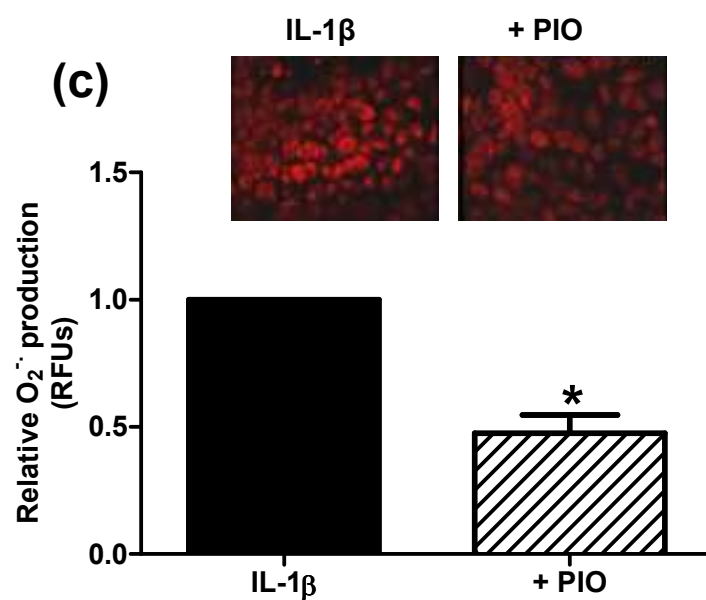
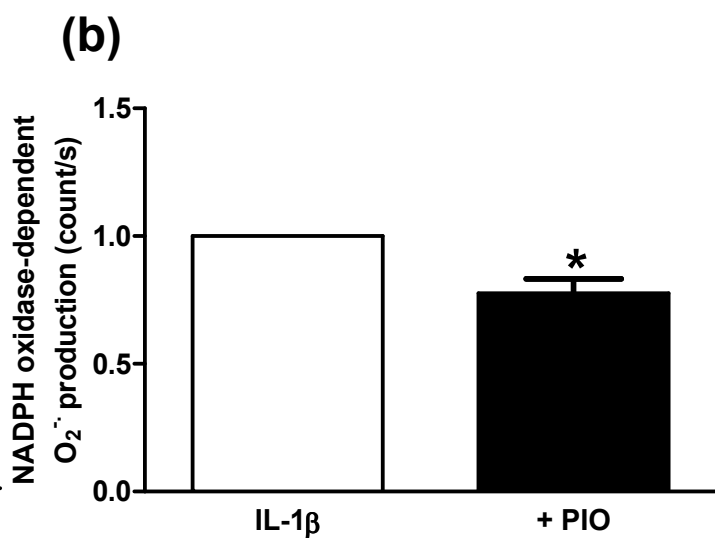
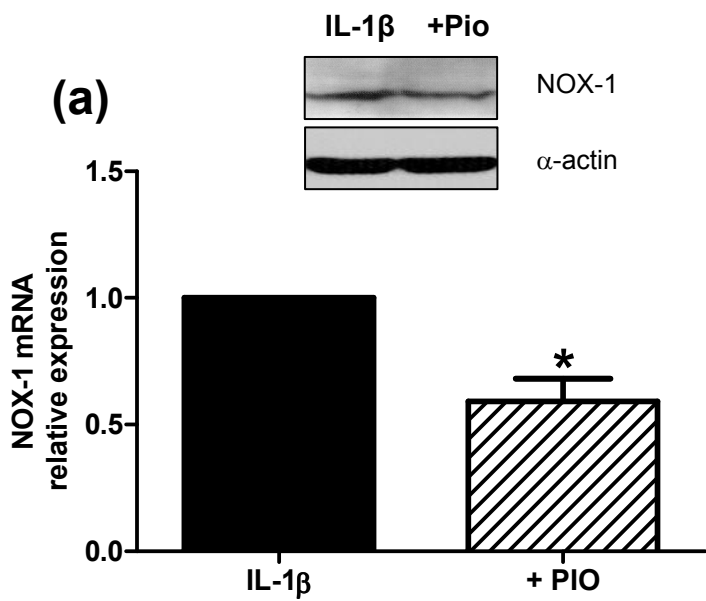
* $P < 0.05$ vs control; ⁺ $P < 0.05$ vs IL-1 β . $n = 4$ to 7.

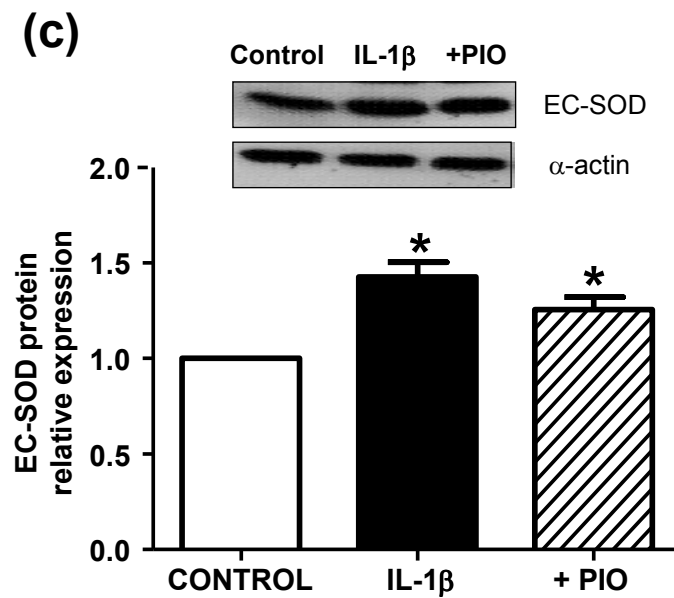
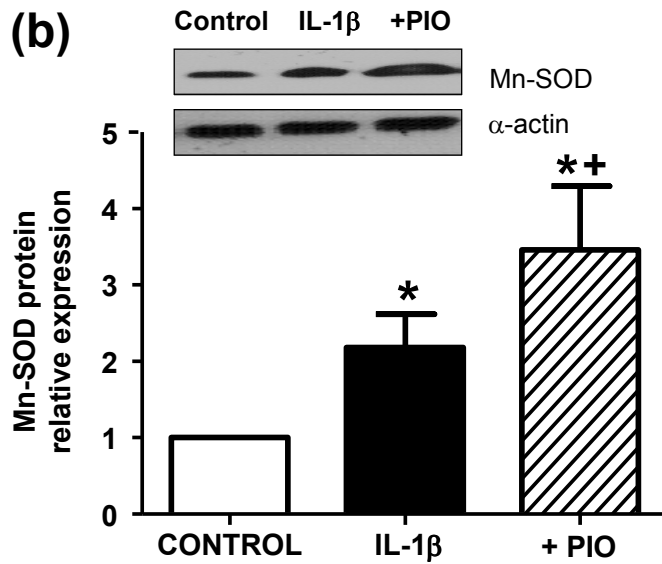
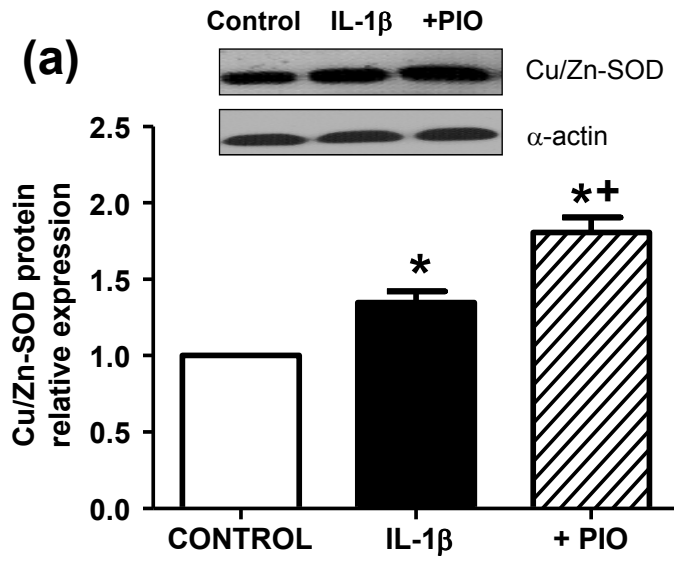
Fig. 6. (a) Effect of lactacystin (5 $\mu\text{mol/L}$) on COX-2 mRNA levels induced by IL-1 β (10 ng/mL; 24 h) in VSMC. Results are expressed as relative mRNA levels compared to IL-1 β . (b) Representative blot of the cytosolic (Cy) and nuclear (Nu) expression of the p65 NF- κ B subunit in control and after IL-1 β in the absence and presence of pioglitazone (PIO, 10 $\mu\text{mol/L}$) and apocynin (APO, 30 $\mu\text{mol/L}$). TBP Cy and Nu expression is also shown to guarantee the successful cellular fractioning. Histograms show the effect of IL-1 β in the absence and presence of PIO and APO on nuclear expression of the p65 NF- κ B subunit. (c) Effect of IL-1 β on p-IKK protein expression in the absence and presence of PIO and APO. Results are expressed as relative expression compared to control. * $P < 0.05$ vs control; ⁺ $P < 0.05$ vs IL-1 β . $n = 4$.

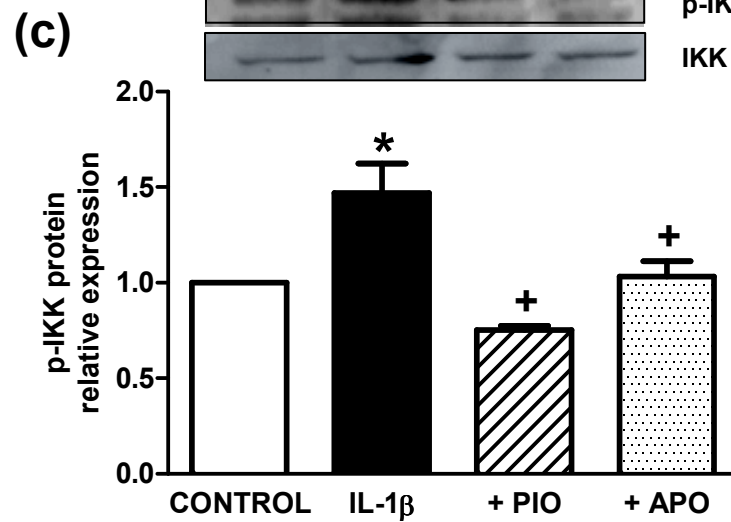
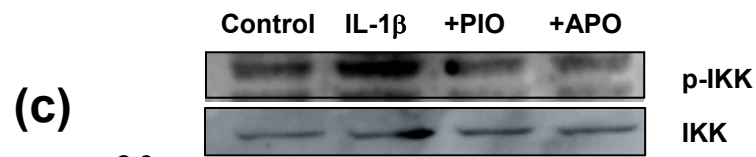
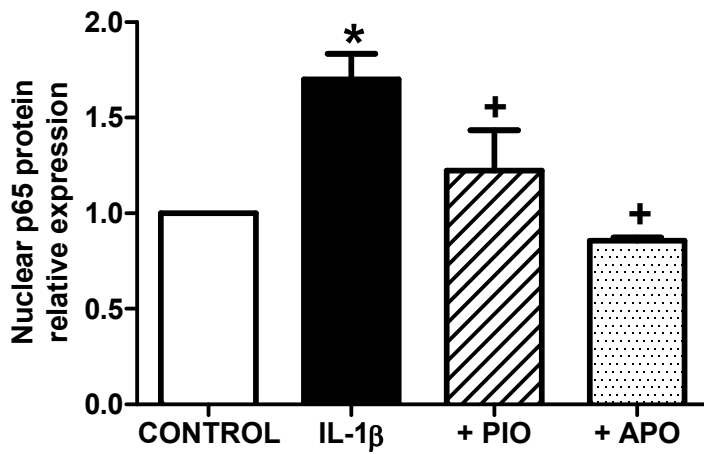
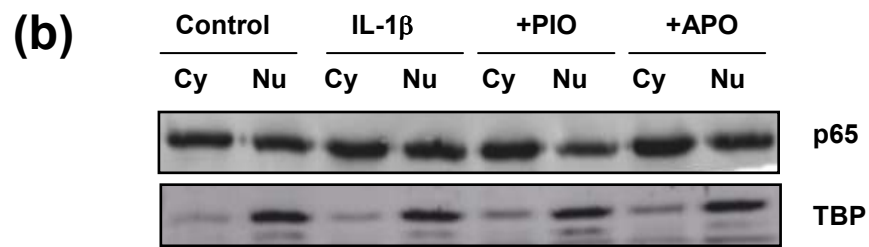
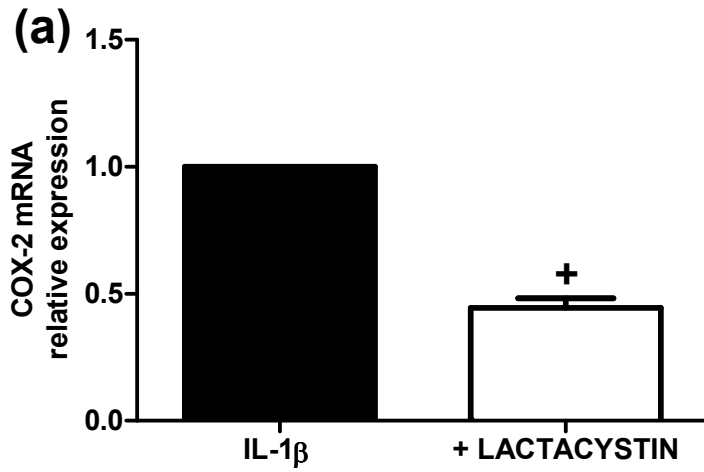














Pioglitazone treatment increases COX-2 derived PGI₂ production and reduces oxidative stress in hypertensive rats. Role on vascular function.

Journal:	<i>British Journal of Pharmacology</i>
Manuscript ID:	2011-BJP-0169-RP.R2
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Hernanz, Raquel; Universidad Rey Juan Carlos, Depto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular Martín, Angela; Universidad Rey Juan Carlos, Depto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular Pérez, Jose; Universidad Rey Juan Carlos, Depto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular Palacios, Roberto; Universidad Rey Juan Carlos, Depto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular Briones, Ana; Universidad Autonoma de Madrid, Farmacologia Miguel, Marta; Universidad Autonoma de Madrid, Farmacologia Salaices, Mercedes; Universidad Madrid; Universidad Autonoma de Madrid, Farmacologia Alonso, María; Universidad Rey Juan Carlos, Department of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics
Publication category:	Cardiovascular pharmacology
Keywords:	Eicosanoids < B. Mediators, Receptors, Transporters, Channels & Ligands, Nitric oxide < B. Mediators, Receptors, Transporters, Channels & Ligands, Inflammation < D. Functional systems, Nuclear receptors < B. Mediators, Receptors, Transporters, Channels & Ligands

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Pioglitazone treatment increases COX-2 derived PGI₂ production and reduces**
4 **oxidative stress in hypertensive rats. Role on vascular function.**
5
6
7
8
9

10 Raquel Hernanz¹, Ángela Martín¹, Jose V. Pérez-Girón¹, Roberto Palacios¹, Ana M.
11 Briones², Marta Miguel², Mercedes Salaices², María J. Alonso¹
12
13
14
15
16

17 ¹Depto. de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular, Universidad Rey Juan Carlos
18 and ²Depto. de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid
19
20
21
22
23
24

25 **Short title:** Vascular PGI₂, ROS and pioglitazone in SHR
26
27
28
29

30 **Correspondence:**
31

32 Dr. María J. Alonso
33
34

35 Departamento de Bioquímica, Fisiología y Genética Molecular
36
37

38 Universidad Rey Juan Carlos
39

40 Avda. de Atenas s/n, 28922 Alcorcón, Spain
41

42 Phone: 00-34-91-4888875; Fax: 00-34-91-4888831
43
44

45 E-mail: mariajesus.alonso@urjc.es
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Summary

Background and purpose: PPAR γ agonists, glitazones, have cardioprotective and anti-inflammatory actions associated to gene transcription interference. This study analyzes if chronic treatment with pioglitazone of adult spontaneously hypertensive rats (SHR) alters blood pressure and vascular structure and function, and the possible mechanisms involved.

Experimental approach: Mesenteric resistance arteries from SHR untreated or pioglitazone-treated (2.5 mg.Kg⁻¹.day⁻¹, 28 days) and normotensive (WKY) rats were used. Vascular structure was studied by pressure myography, vascular function by wire myography, protein expression by western blot and immunohistochemistry, mRNA levels by RT-PCR, prostanoid levels by commercial kits and reactive oxygen species (ROS) production by dihydroethidium-emitted fluorescence.

Key Results: In SHR, pioglitazone treatment did not modify either blood pressure or vascular structural and mechanical alterations or phenylephrine-induced contraction, although it increased vascular COX-2 levels, PGI₂ production and the inhibitory effects of NS 398, SQ 29,548 and tranylcypromine on phenylephrine responses. The contractile phase of iloprost response, which was reduced by SQ 29,548, was greater in pioglitazone-treated and -untreated SHR than WKY. In addition, pioglitazone abolished the increased vascular ROS production, NOX-1 levels and the inhibitory effect of apocynin and allopurinol on phenylephrine contraction, while did not modify eNOS expression but restored the potentiatory effect of L-NAME on phenylephrine response.

Conclusions and implications: Pioglitazone treatment, although did not reduce blood pressure in SHR, increased COX-2-derived PGI₂ production, reduced oxidative stress, and increased NO bioavailability, all of them involved on vasoconstrictor responses in

1
2
3 resistance arteries. These effects would contribute to the cardioprotective effect of
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

resistance arteries. These effects would contribute to the cardioprotective effect of
glitazones reported in several pathologies.

Key words: pioglitazone, PPAR γ , hypertension, resistance arteries, prostacyclin,
oxidative stress, nitric oxide

For Peer Review

Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) are ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear hormone receptor superfamily that have an important role on adipocyte differentiation and carbohydrate homeostasis (Leff *et al.*, 2004). PPAR γ is expressed in all components of the vascular system including endothelial cells, vascular smooth muscle cells (VSMC) and monocytes/macrophages (Touyz & Schiffrin, 2006; Matsumoto *et al.*, 2008), raising the possibility of direct effects of PPAR γ activation on vascular tone and blood pressure. PPAR γ agonists such as pioglitazone and rosiglitazone have a blood pressure lowering action in patients or animal models in which hypertension is associated with diabetes or with other factors of metabolic syndrome, such as obese Zucker fatty rats, high fat diet-induced obesity or fructose fed rats (Sarafidis & Nilsson, 2006; Chen *et al.*, 2008). However, results on blood pressure in patients or animal models with neither diabetes nor other factors of metabolic syndrome are controversial (Diep *et al.*, 2002; Wakino *et al.*, 2005; Llorens *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2007; Shinzato *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Interestingly, several evidences indicate that these agents are able to interfere with the pathophysiology of target organ damage in hypertension (Dormandy *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2007; Shinzato *et al.*, 2007). On the other hand, associated to blood pressure reduction, correction of vascular structure abnormalities has also been described (Diep *et al.*, 2002; Ledingham & Laverty, 2005; Zhang *et al.*, 2010).

The mechanisms responsible of the beneficial effects of PPAR γ agonists remain elusive. One attractive hypothesis has been put forward by the fact that these drugs might act as direct anti-inflammatory agents, regulating the production of immunomodulatory and inflammatory mediators. Thus, PPAR γ is able to regulate gene expression in a DNA-independent fashion by interfering with pro-inflammatory

1
2
3 transcription factors, such as NF- κ B, AP-1 or STAT (Touyz & Schiffrin, 2006).
4
5 Inflammation is a key feature in the initiation, progression, and clinical implications of
6
7 cardiovascular disorders, including essential hypertension. Thus, increased blood levels
8
9 of pro-inflammatory cytokines, vascular cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and
10
11 oxidative stress together with reduced nitric oxide (NO) availability are well established
12
13 hallmarks of hypertension (Briones *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2005; Paravicini &
14
15 Touyz, 2006; Savoia & Schiffrin, 2007; Virdis *et al.*, 2009). PPAR γ activation in the
16
17 vascular wall inhibits among others, cytokines production, expression of adhesion
18
19 molecules and metalloproteinases, and proliferation and migration of VSMC (Touyz &
20
21 Schiffrin, 2006). In addition, PPAR γ agonists inhibit the expression of several
22
23 components of the NADPH oxidase, the main source of superoxide anion (O $_2^{\cdot-}$) at
24
25 vascular level, and the subsequent production of reactive oxygen species (ROS), thus
26
27 contributing to the anti-inflammatory and the vascular protective effects of these drugs
28
29 (Hwang *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2007). In different inflammatory models, it has
30
31 been shown that the anti-inflammatory effect of PPAR γ agonists is related to reduction
32
33 of the increased COX-2 expression (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2005; Collino *et al.*, 2006),
34
35 although increased COX-2 expression has been also observed after PPAR γ activation
36
37 (Meade *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008).
38
39
40
41
42
43
44

45
46 In the present study we analyze the effect of the treatment of spontaneously
47
48 hypertensive rats (SHR) with pioglitazone on blood pressure and on the structural,
49
50 mechanical and functional properties of mesenteric resistance arteries (MRA). In addition
51
52 the role of COX-2-derived prostanoids, NO and ROS in phenylephrine responses was also
53
54 analyzed.
55
56
57
58
59
60

Methods

Animals

The investigation conforms to the current Spanish and European laws (RD 223/88 MAPA and 609/86). Six-month old male normotensive Wistar Kyoto (WKY) and SHR rats, obtained from colonies maintained at the Animal Quarters of the Facultad de Ciencias de la Salud of the Universidad Rey Juan Carlos (ES280920000023), were used. SHR were divided into two groups: control (receiving vehicle) and rats treated with the PPAR γ agonist pioglitazone (2.5 mg.Kg⁻¹.day⁻¹, for 28 days suspended in 0.5% methylcellulose and administered in drinking water). This dose has been reported to achieve a concentration equivalent to that reported in humans who were administered 15 mg dose of pioglitazone (Ishibashi *et al.*, 2002). Systolic blood pressure was weekly measured using tail cuff plethysmography. Rats were euthanized by decapitation and the mesenteric arcade was removed and placed in Krebs Henseleit solution (KHS) of the following composition (in mM): NaCl 115.0; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄.7H₂O 1.2; NaHCO₃ 25.0; glucose 11.1 and Na₂EDTA 0.01, maintained at 4°C and continuously gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Segments of third order branches of the mesenteric artery were dissected free of fat and connective tissue and used for vascular structure and function studies as well as O₂⁻ production. The second and third order branches were used to analyze the prostanoids production, mRNA levels and protein expression.

Blood samples were collected in tubes containing 15% K₃EDTA as anticoagulant (BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Plymouth, UK) and placed in ice. Blood samples were centrifuged at 1500xg for 15 min at 4°C. The obtained plasma was frozen at -20°C and kept at -70°C until used to determine malondialdehyde (MDA) concentration.

Pressure myography

The structural and mechanical properties of MRA were studied with a pressure myograph (Danish Myo Tech, Model P100, J.P. Trading I/S, Aarhus, Denmark). Vessels were placed on two glass microcannulae and secured with surgical nylon suture. After any small branches were tied off, vessel length was adjusted so that the vessel walls were parallel without stretch. Intraluminal pressure was then raised to 140 mmHg and the artery was unbuckled by adjusting the cannulae. The segment was then set to a pressure of 70 mmHg and allowed to equilibrate for 60 min at 37°C in calcium-free KHS (0Ca²⁺; omitting calcium and adding 1 mM EGTA) intra and extra-vascular perfused gassed with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂. Intraluminal pressure was reduced to 3 mmHg. A pressure-diameter curve was obtained by increasing intraluminal pressure in 20 mmHg steps between 3 and 140 mmHg. Internal and external diameters were continuously measured under passive conditions (D_{i0Ca}, D_{e0Ca}) for 3 min at each intraluminal pressure. The final value used was the mean of the measurements taken during the last 30 seconds when the measurements reached a steady state. Finally, the artery was set to 70 mmHg in 0Ca²⁺-KHS, pressure-fixed with 4% paraformaldehyde (PFA, in 0.2 M phosphate buffer, pH 7.2-7.4) at 37°C for 60 min and kept in 4% PFA at 4°C for confocal microscopy studies.

Calculation of passive structural and mechanical parameters. From internal and external diameter measurements in passive conditions the following structural and mechanical parameters were calculated:

$$\text{Wall thickness, WT} = (D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2$$

$$\text{Cross sectional area, CSA} = (\pi/4) \times (D_{e0Ca}^2 - D_{i0Ca}^2)$$

$$\text{Wall:lumen} = (D_{e0Ca} - D_{i0Ca}) / 2D_{i0Ca}$$

1
2
3 Incremental distensibility represents the percentage of change of the arterial
4 internal diameter for each mmHg change in intraluminal pressure and was calculated
5 according to the formula:
6
7
8

$$\text{Incremental distensibility} = \Delta D_{i0Ca} / (D_{i0Ca} \times \Delta P) \times 100.$$

9
10
11
12 Circumferential wall strain (ϵ) = $(D_{i0Ca} - D_{00Ca}) / D_{00Ca}$, where D_{00Ca} is the internal
13 diameter at 3 mmHg and D_{i0Ca} is the observed internal diameter for a given intravascular
14 pressure both measured in $0Ca^{2+}$ medium.
15
16
17
18

19
20
21 Circumferential wall stress (σ) = $(P \times D_{i0Ca}) / (2WT)$, where P is the intraluminal
22 pressure ($1 \text{ mmHg} = 1.334 \times 10^3 \text{ dynes/cm}^2$) and WT is wall thickness at each intraluminal
23 pressure in $0Ca^{2+}$ -KHS.
24
25
26
27

28
29 Arterial stiffness independent of geometry is determined by the Young's elastic
30 modulus ($E = \text{stress}/\text{strain}$). The stress-strain relationship is non-linear; therefore, it is more
31 appropriate to obtain a tangential or incremental elastic modulus (E_{inc}) by determining the
32 slope of the stress-strain curve ($E_{inc} = \delta\sigma / \delta\epsilon$). E_{inc} was obtained by fitting the stress-strain
33 data from each animal to an exponential curve using the equation: $\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\epsilon}$, where σ_{orig}
34 is the stress at the original diameter (diameter at 3 mmHg). Taking derivatives on the
35 above equation we see that $E_{inc} = \beta\sigma$. For a given σ value, E_{inc} is directly proportional to β .
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46 An increase in β implies an increase in E_{inc} which means an increase in stiffness.
47

48 *Confocal microscopy study of nuclei distribution*

49
50
51 Pressure fixed intact arteries were incubated with the nuclear dye Hoechst 33342 (0.01
52 mg/ml) for 15 min. After washing, the arteries were mounted on slides with a well
53 made of silicon spacers to avoid artery deformation. They were viewed using a Leica
54 TCS SP5 confocal system fitted with an inverted microscope and Argon and Helium-
55 Neon laser sources with oil immersion lens (x40) (Ex 351-364 nm and Em 400-500
56
57
58
59
60

1
2
3 nm). At least two serial optical sections (stacks of images) of 0.5 μm thick serial optical
4
5
6 slices were taken from the adventitia to the lumen in different regions along the artery
7
8
9 length. Thereafter, individual projections of the vessel were reconstructed with
10
11 Metamorph image analysis software (Molecular Devices Corp. Downingtown, PA,
12
13 USA) and transversal view of the stack was obtained.

14
15
16 The total wall thickness occupied by the different cell types was measured in the
17
18 z-axis, as previously described (Arribas *et al.*, 2007) with some modifications. Briefly,
19
20 by using Metamorph software we measured the fluorescence intensity of stained nuclei.
21
22 We then considered the first plane of the adventitia as the one with the maximum
23
24 intensity on the first adventitial cell. Similarly, the last plane of the intima was
25
26 considered to be that which showed the last endothelial nucleus at its maximum
27
28 intensity.
29
30

31 32 33 *Reactivity experiments*

34
35 Ring segments, 2 mm in length, were mounted in a small vessel dual chamber
36
37 myograph for measurement of isometric tension (Briones *et al.*, 2002). Segment
38
39 contractility was tested by an initial exposure to a high K^+ solution (120 mM K^+ -KHS,
40
41 which was identical to KHS except that NaCl was replaced by KCl on an equimolar
42
43 basis). The response to K^+ -KHS was similar ($P > 0.05$) in arteries from the three groups
44
45 (WKY: $3.3 \pm 0.2 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$, $n = 30$; SHR: $3.2 \pm 0.1 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$, $n = 45$; SHR
46
47 pioglitazone: $3.1 \pm 0.1 \text{ mN}\cdot\text{mm}^{-1}$, $n = 38$). The presence of endothelium was determined
48
49 by the ability of 10 μM acetylcholine to relax arteries precontracted with phenylephrine
50
51 at a concentration that produce approximately 50% of the contraction induced by K^+ -
52
53 KHS in each case. Thereafter, a cumulative concentration-response curve to
54
55 phenylephrine (0.1-30 μM) was performed. The effects of NS 398, SQ 29,548, SC
56
57 19220, RO 1138452, SQ 29,458 plus RO 1138452, furegrelate, tranylecypromine,
58
59
60

1
2
3 apocynin, allopurinol and N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were analyzed by
4
5 their addition 30 min before the phenylephrine concentration-response curve. In some
6
7 experiments, the endothelium was mechanically removed and the concentration-
8
9 response curve to phenylephrine was performed in the absence and the presence of NS
10
11 398 and SQ 29,548. Endothelium removal was assessed by the inability of 10 μ M
12
13 acetylcholine to produce vasodilatation. In other set of experiments, iloprost (1 μ M) was
14
15 added to arteries precontracted with phenylephrine at a concentration that produce
16
17 approximately 50% of the contraction induced by K^+ -KHS in each case. The effects of
18
19 SQ 29,548, SC 19220 and RO 1138452 on the iloprost-induced response were analyzed
20
21 by their addition 30 min before iloprost.
22
23
24
25

26
27 Vasoconstrictor responses were expressed as a percentage of the tone generated
28
29 by K^+ -KHS. Vasodilator responses were expressed as a percentage of the previous tone
30
31 in each case. To compare the effect of drugs on the response to phenylephrine in
32
33 segments from different groups, results were expressed as differences of area under the
34
35 concentration-response curves (dAUC) in control and experimental situations. AUCs
36
37 were calculated from the individual concentration-response curve plots using a
38
39 computer program (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA); the differences
40
41 were expressed as a percentage of the AUC of the corresponding control situation.
42
43
44
45

46 *Protein expression determination by Western blot*

47

48
49 Protein expression was determined in homogenates from the mesenteric arteries
50
51 obtained in ice-cold Tris-EDTA buffer (in mM: Tris-50, EDTA-1.0, pH=7.4). Proteins
52
53 [5 μ g protein for Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD), 20 μ g protein for EC-
54
55 SOD and endothelial NO synthase (eNOS) and 40 μ g protein for COX-2] were
56
57 separated by 7.5% (eNOS), 10% (COX-2) or 12% (Cu/Zn-, Mn- and EC-SOD) SDS-
58
59 PAGE. Proteins were transferred to polyvinyl difluoride membranes that were incubated
60

1
2
3 with rabbit polyclonal antibodies for COX-2 (1:200; Cayman Chemical; Ann Arbor,
4 MI, USA), Cu/Zn-SOD (0.1 µg/ml, StressGen Bioreagents Corp, Victoria, Canada),
5 Mn-SOD (0.05 µg/ml, StressGen Bioreagents Corp) or EC-SOD (10 µg/ml, StressGen
6 Bioreagents Corp) and with mouse monoclonal antibody (1:1,000) for eNOS detection
7 (Transduction Laboratories, Lexington, UK). After washing, membranes were incubated
8 with anti-rabbit (1:2,000, Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) or antimouse
9 (1:5,000, StressGen Bioreagents Corp) IgG antibody conjugated to horseradish
10 peroxidase. The immunocomplexes were detected using an enhanced horseradish
11 peroxidase-luminol chemiluminescence system (ECL Plus, Amersham International;
12 Little Chalfont, UK) and subjected to autoradiography (Minolta Film, Konica Minolta,
13 Wayne, USA). Signals on the immunoblot were quantified using the NIH Image
14 computer program (US, version 1.56). The same membrane was used to determine α -
15 actin expression using a mouse monoclonal anti- α -actin-antibody (1:300,000, Sigma
16 Chemical Co, St. Louis, MO, USA).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Data of protein expression are expressed as the ratio between signals on the
37 immunoblot corresponding to the studied protein and that of α -actin. To compare the
38 results for protein expression, we assigned a value of 1 to the expression of arteries
39 from WKY rats.
40
41
42
43
44
45

46 *mRNA levels determination by qRT-PCR assay*

47
48

49 COX-2, IP receptor, TP receptor, NOX-1, NOX-2, p47phox, catalase and
50 PPAR γ mRNA levels were determined in mesenteric arteries. Total RNA was obtained
51 by using TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A total of 1 µg of
52 DNase I treated RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity
53 cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 50 µl reaction.
54
55
56
57
58
59
60 PCR was performed in duplicate for each sample using 0.5 µl of cDNA as template, 1x

1
2
3 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 20x of Taqman Gene
4
5 Expression Assays (Applied Biosystems, COX-2: Rn00568225_m1; IP receptor:
6
7 Rn01764022_m1; TP receptor: Rn00690601_m1; NOX-1: Rn00586652_m1; p47phox:
8
9 Rn00586945_m1; catalase: Rn00560930_m1; PPAR γ : Rn00440945_m1) or specific
10
11 primers for NOX-2: (forward CCAGTGAAGATGTGTTTCAGCT; reverse
12
13 GCACAGCCAGTAGAAGTAGAT) purchased to Sigma-Aldrich and Fast Start
14
15 Universal SYBR Green Master (Rox) in a 20 μ l reaction. For quantification,
16
17 quantitative RT-PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection
18
19 System (Applied Biosystems, from the CAT of Universidad Rey Juan Carlos) using the
20
21 following conditions: 2 min 50°C, 10 min 95°C and 40 cycles: 15 s 95°C, 1 min 60°C.
22
23 As a normalizing internal control we amplified β_2 microglobulin (Rn00560865_m1). To
24
25 calculate the relative index of gene expression, we employed the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak
26
27 & Schmittgen, 2001) using WKY or untreated SHR as calibrator.
28
29
30
31
32
33

34 *Measurement of Prostaglandin F_{2 α} , Prostacyclin and 8-isoprostane* 35 36 37 *production*

38
39 The levels of 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2 α} , the metabolite of PGF_{2 α} , 6-keto-PGF_{1 α} , the
40
41 metabolite of prostacyclin (PGI₂), and 8-isoprostane were measured in the incubation
42
43 medium after completion of the phenylephrine concentration-response curves, using
44
45 enzyme immunoassay commercial kits (Cayman Chemical). The medium was frozen in
46
47 liquid nitrogen, kept at -70°C until analysis and processed following the manufacturer
48
49 instructions.
50
51
52
53

54 *In situ detection of vascular superoxide anion production*

55
56 The oxidative fluorescent dye dihydroethidium was used to evaluate O₂⁻ production in
57
58 situ, as previously described (García-Redondo *et al.*, 2009). 14 μ m frozen cross sections
59
60

1
2
3 were incubated in a humidified chamber for 30 min in Krebs HEPES solution (in mM:
4
5 119 NaCl, 20 HEPES, 1 MgSO₄, 0.15 Na₂HPO₄, 4.6 KCl, 0.4 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 1.2
6
7 CaCl₂, 11.1 glucose, pH 7.4) at 37°C, and then incubated for 30 min in Krebs HEPES
8
9 solution containing dihydroethidium (10 μM) in the dark. Each day of experiment,
10
11 images of the 3 different experimental conditions (WKY and pioglitazone-treated and
12
13 untreated SHR) were taken with a fluorescent laser scanning confocal microscope
14
15 (Leica TCS SP2) using a x40_{oil} objective with the 568 nm/600-700 nm
16
17 excitation/emission filter always using the same imaging settings.
18
19
20
21

22 *Measurement of MDA production*

23
24
25 Plasmatic MDA levels were measured by a modified thiobarbituric acid (TBA) assay, as
26
27 previously described (Alvarez *et al.*, 2007).
28
29

30 *Statistical analysis and drugs*

31
32
33 All values are expressed as mean ± SEM. “n” represents the number of animals used in
34
35 each experiment. The maximum response (E_{max}) and pD₂ values were calculated by a
36
37 non-linear regression analysis of each individual concentration-response curve using
38
39 GraphPad Prism Software (San Diego, CA, USA). Results were analyzed by using
40
41 Student’s *t*-test or two way ANOVA followed by a Bonferroni’s *post hoc* test.
42
43 Probability value of less than 5% was considered significant.
44
45
46
47

48 Phenylephrine, acetylcholine, SC 19220, furegrelate, tranylcypromine, L-NAME
49
50 were obtained from Sigma Chemical, Co. NS 398 was obtained from Calbiochem-
51
52 Novabiochem GmbH (Bad Soden, Germany), allopurinol from Research Biochemicals
53
54 Incorporated (Natick, MA, USA), apocynin from Fluka-Sigma Chemical (Seelze,
55
56 Germany) and SQ 29,548, RO 1138452 and iloprost from Cayman Chemical.
57
58 Pioglitazone was generously supplied by Takeda-Lilly Spain.
59
60

Results

Pioglitazone treatment ($2.5 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$, 28 days) of SHR did not modify either systolic blood pressure (before: 200.9 ± 3.2 , after: $199.9 \pm 1.7 \text{ mmHg}$, $n = 17$; $P > 0.05$) or body weight (results not shown).

Effect of pioglitazone treatment on vascular remodelling and stiffness

Mesenteric resistance arteries from hypertensive rats showed lower external (Figure 1A) and internal (Figure 1B) diameters compared to normotensive rats; pioglitazone treatment did not affect any of these parameters (Figure 1). Similar results were obtained when internal diameter was measured using the wire myograph; MRA from SHR showed diminished internal diameter (WKY: $270.2 \pm 4.8 \mu\text{m}$, $n = 30$; SHR: $241.2 \pm 2.9 \mu\text{m}$, $n = 45$; $P < 0.05$) which was not modified by pioglitazone treatment ($243.8 \pm 1.2 \mu\text{m}$, $n = 38$; $P > 0.05$). However, wall:lumen ratio was greater in arteries from SHR and unaffected by pioglitazone (Figure 1C). Transversal confocal projections of the whole vascular wall of arteries also showed increased wall thickness in the SHR vessels (WKY: $30.42 \pm 1.47 \mu\text{m}$, $n = 5$; SHR: $37.94 \pm 1.47 \mu\text{m}$, $n = 5$; $P < 0.05$) that was unaffected by pioglitazone treatment ($39.72 \pm 3.72 \mu\text{m}$, $n = 6$; $P > 0.05$; Figure 1D).

Vessels from SHR rats showed decreased elasticity, as shown by the larger value of β (WKY: 4.75 ± 0.20 , $n = 8$; SHR: 8.57 ± 1.02 , $n = 8$; $P < 0.05$), and a leftward shift of the stress-strain relationship (Figure 1E). Incremental distensibility was also smaller in MRA from SHR (Figure 1F). Pioglitazone treatment did not affect any of the parameters studied (Figures 1E and 1F). Thus, β value was similar in arteries from pioglitazone-treated (8.36 ± 0.71 ; $n = 9$; $P > 0.05$) and untreated SHR rats.

1
2
3
4
5
6
7 *Effect of Pioglitazone treatment on the participation of COX-2-derived*
8 *prostanoids in phenylephrine contraction*
9

10
11
12 The mRNA levels of PPAR γ were lower in mesenteric arteries from hypertensive than
13 normotensive rats; after pioglitazone treatment of SHR, these levels were greatly
14 increased (Figure 2A). On the other hand, we have previously described that COX-2
15 protein expression was greater in MRA from SHR than WKY (Briones *et al.*, 2002);
16 herein, we have confirmed these results and we have also observed increased COX-2
17 mRNA levels in SHR compared to WKY (Figure 2B). After pioglitazone treatment,
18 both COX-2 protein and mRNA levels were increased (Figure 2B).
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28
29 The endothelium-dependent vasodilator response induced by acetylcholine (10
30 μM) was reduced in MRA from SHR (WKY: $91.4 \pm 0.9\%$, $n = 30$; SHR: $78.3 \pm 1.1\%$, n
31 = 45; $P < 0.05$); the treatment with pioglitazone improved this response, although it was
32 still lesser than the observed in arteries from normotensive rats ($83.1 \pm 1.9\%$, $n = 38$, $P <$
33 0.05 vs SHR and vs WKY). Phenylephrine (0.1-30 μM) induced concentration-
34 dependent contractile responses in MRA that were similar in arteries from normotensive
35 and hypertensive rats; pioglitazone treatment did not modify the response to
36 phenylephrine in SHR rats (Figure 3A). The selective COX-2 inhibitor NS 398 (1 μM)
37 did not modify the phenylephrine-induced contraction in arteries from WKY and SHR
38 (Figures 3B and 3C, Table 1). However, in endothelium-intact arteries from
39 pioglitazone-treated SHR, NS 398 inhibited the phenylephrine response (Figure 3D,
40 Table 1). These results suggest that pioglitazone treatment increases the participation of
41 COX-2-derived contractile prostanoids in phenylephrine responses.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

After endothelium removal, the concentration-response curve to phenylephrine
observed in segments from pioglitazone-treated rats was leftward shifted (E_{max} : 115.2

1
2
3 $\pm 2.1\%$ vs 130.9 ± 2.6 for E+, $n = 38$, and E-, $n = 8$, respectively, $P < 0.05$; pD_2 : $5.51 \pm$
4
5
6 0.02 vs 5.74 ± 0.03 for E+ and E-, respectively, $P < 0.05$), in a similar extent that the
7
8 observed in untreated SHR (data not shown). In endothelium-denuded segments from
9
10 pioglitazone-treated rats, NS 398 ($1 \mu\text{M}$) inhibited the contractile response to
11
12 phenylephrine (Figure 3E); however, this inhibitory effect was much smaller than the
13
14 one observed in endothelium-intact segments, as shown by the comparison of dAUC
15
16 values (Table 1).
17
18

19
20
21 *Involvement of prostacyclin on phenylephrine responses through TP*
22
23 *receptor*
24

25
26 The EP₁/EP₃ receptor antagonist SC 19220 ($10 \mu\text{M}$), the TP receptor antagonist SQ
27
28 29,548 ($1 \mu\text{M}$), the TXA₂ synthase inhibitor furegrelate ($1 \mu\text{M}$) and the PGI₂ synthase
29
30 inhibitor tranilcypromine ($10 \mu\text{M}$) did not modify the concentration-response curve to
31
32 phenylephrine in arteries from SHR (Table 1). In pioglitazone-treated rats, neither SC
33
34 19220 nor furegrelate did affect the phenylephrine-induced contraction; this response
35
36 was reduced by SQ 29,548 in endothelium-intact but not in endothelium-denuded
37
38 segments (Figure 4). Tranilcypromine, but not the IP receptor antagonist RO 1138452
39
40 ($1 \mu\text{M}$), reduced phenylephrine response. The combination of SQ 29,548 and RO
41
42 1138452 reduced the vasoconstrictor response (Figure 4) in a similar extent that SQ
43
44 29,548 alone, as shown by the comparison of dAUC values (Table 1). These results
45
46 suggest that endothelium-derived prostanoids other than TXA₂, likely PGI₂ by acting on
47
48 the TP receptor, contribute to the vasoconstrictor effect of phenylephrine on MRA from
49
50 pioglitazone-treated SHR rats.
51
52
53
54
55

56
57 The production of 6-keto-PGF_{1 α} was lower in the incubation medium of MRA
58
59 from hypertensive than normotensive rats after stimulation with phenylephrine; these
60
levels were greater in pioglitazone-treated rats (Figure 5A). 8-isoprostane and PGF_{2 α} are

1
2
3 other COX-derived products that may induce contraction acting on TP receptor. The
4
5 levels of 8-isoprostane were similar in arteries from WKY ($0.062 \pm 0.022 \text{ pg} \cdot \mu\text{g}^{-1}$
6
7 protein, $n = 6$) and SHR ($0.061 \pm 0.008 \text{ pg} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ protein, $n = 5$, $P > 0.05$), and pioglitazone
8
9 treatment did not modify these levels ($0.046 \pm 0.013 \text{ pg} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ protein, $n = 5$, $P > 0.05$ vs
10
11 SHR). The levels of 13,14-dihydro-15-keto-PGF_{2α} were similar in arteries from WKY
12
13 ($2.92 \pm 0.59 \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, $n = 6$) and SHR ($3.92 \pm 1.19 \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, $n = 5$,
14
15 $P > 0.05$ vs WKY) and pioglitazone treatment did not modify these levels (5.92 ± 1.39
16
17 $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein, $n = 5$, $P > 0.05$ vs SHR).

18
19
20
21
22 In segments pre-contracted with phenylephrine, the prostacyclin analogue
23
24 iloprost (1 μM) induced a biphasic response consisting in a fast contraction followed by
25
26 a slow relaxation (Figure 5B). The contractile phase was greater in arteries from SHR
27
28 than WKY and remained unaltered after pioglitazone treatment (Figure 5C). In MRA
29
30 from pioglitazone-treated rats, the contractile response elicited by iloprost was not
31
32 modified by either RO 1138452 or SC 19220, but was reduced by SQ 29,548 (Figure
33
34 5C); similar results were obtained in untreated SHR (data not shown). The vasodilator
35
36 phase of the response to iloprost was slower in arteries from SHR than WKY, as shown
37
38 by the time-response curve (Figure 5D); pioglitazone treatment did not modify this
39
40 response (Figure 5D). In MRA from pioglitazone-treated rats the relaxation induced by
41
42 iloprost was almost abolished by RO 1138452 and unaffected by SC 19220; after
43
44 incubation with SQ 29,548 this relaxing phase was faster (Figure 5D); in untreated
45
46 SHR, similar results were observed (data not shown). All together, these results suggest
47
48 that iloprost may act as a vasoconstrictor through TP receptors. mRNA levels of both
49
50 TP and IP receptors were greater in arteries from SHR than from WKY (Figure 5E);
51
52 pioglitazone reduced those levels (Figure 5E).
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Effect of Pioglitazone treatment on the participation of reactive oxygen species in phenylephrine contraction

The involvement of ROS was evaluated using the NADPH oxidase inhibitor apocynin and the xanthine oxidase inhibitor allopurinol. In MRA from both WKY and SHR rats, apocynin (0.3 mM) reduced the contractile response induced by phenylephrine (Figure 6A), although the inhibitory effect was greater in arteries from hypertensive rats, as shown by the analysis of dAUC (Table 1). Allopurinol (0.3 mM) reduced the response to phenylephrine only in segments from hypertensive rats; pioglitazone treatment abolished the effect of both apocynin and allopurinol (Figure 6A, Table 1).

26
27
28
29
30

Effect of Pioglitazone on vascular superoxide anion production, mRNA levels of NADPH oxidase subunits and plasmatic MDA levels

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

As we previously described (García-Redondo *et al.*, 2009), O_2^- production was greater in MRA from hypertensive than normotensive animals (Figure 6B). In agreement, vascular mRNA levels of NOX-1 were also greater in arteries from SHR than from WKY (Figure 6C). Pioglitazone treatment normalized the increased O_2^- production and NOX-1 mRNA levels (Figures 6B and 6C). In addition, pioglitazone also reduced the mRNA levels of both NOX-2 (relative expression; SHR: 1.12 ± 0.25 , $n = 6$; SHR-treated: 0.47 ± 0.10 , $n = 7$, $P < 0.05$) and p47phox (relative expression; SHR: 1.14 ± 0.21 , $n = 8$; SHR-treated: 0.25 ± 0.06 , $n = 7$, $P < 0.05$).

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Plasmatic MDA levels were also higher in SHR than in WKY rats, as previously reported (Alvarez *et al.*, 2007). This difference was unaffected by pioglitazone treatment of SHR (Figure 6D).

Effect of Pioglitazone on vascular expression of detoxificant enzymes

Western blot analysis revealed lower expression of Cu/Zn-, Mn- and EC-SOD in MRA from SHR than from WKY (Figure 7A). Pioglitazone-treatment did not modify the expression of Cu/Zn- and Mn-SOD, although further reduced the EC-SOD expression (Figure 7A). The catalase mRNA levels were similar in arteries from normotensive and hypertensive rats (Figure 7B); after pioglitazone treatment, arteries from SHR show increased catalase mRNA levels (Figure 7B).

Effect of Pioglitazone treatment on the participation of nitric oxide in phenylephrine contraction

The NOS inhibitor L-NAME leftward shifted the concentration-response curve to phenylephrine in segments from both WKY and SHR (Figure 8A); however, this effect was greater in normotensive rats, as shown by the dAUC analysis (Table 1). In pioglitazone-treated rats, L-NAME also increased the vasoconstrictor response to phenylephrine (Figure 8A) and this effect was greater than the one observed in arteries from untreated SHR rats (Table 1).

eNOS expression was similar in mesenteric resistance arteries from normotensive and hypertensive rats; pioglitazone treatment did not modify the expression of this enzyme (Figure 8B).

Discussion

The present study shows the complex effect of PPAR γ agonists on the modulation of vasoconstrictor responses. Thus, pioglitazone reduces ROS production and its contribution to phenylephrine contraction while increases the contribution of NO to that response. Additionally, pioglitazone increases the production of COX-2-derived PGI $_2$, involved in phenylephrine response acting as vasoconstrictor through TP receptors.

1
2
3 These effects, together with its lack of effect on vascular remodelling, might explain
4 that pioglitazone does not affect blood pressure in established hypertension, although
5
6 would contribute to the cardioprotective effect of glitazones widely reported.
7
8

9
10 The antihypertensive effects of PPAR γ agonists are established in patients or
11 animal models of diabetes and/or metabolic syndrome (Sarafidis & Nilsson, 2006; Chen
12 *et al.*, 2008); however, when hypertension is not associated with diabetes or with other
13 factors of metabolic syndrome, results are controversial. Glitazones prevent
14 hypertension development (Sarafidis & Nilsson, 2006); however, in established
15 hypertension no effects on blood pressure have been described (Llorens *et al.*, 2007;
16 Nakamura *et al.*, 2007; Shinzato *et al.*, 2007), unless long-term treatment (Zhang *et al.*,
17 2010) or high doses of glitazones (Wakino *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2010) were used. In
18 adult SHR, with well established hypertension, treatment for 28 days with 2.5 mg.Kg⁻¹
19 .day⁻¹ pioglitazone did not modify systolic blood pressure.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33
34 Results of glitazones on vascular structure are also controversial. Associated to
35 hypertension development prevention, glitazones also prevent vascular structural
36 abnormalities (Diep *et al.*, 2002; Ledingham & Laverty, 2005). In addition, long-term
37 treatment with a high dose of rosiglitazone attenuated aortic remodelling and systolic
38 blood pressure in young SHR (Zhang *et al.*, 2010). Furthermore, when glitazones
39 treatment starts before or early after hypertension onset, vascular remodelling correction
40 without antihypertensive effect was observed (Ishibashi *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*,
41 2007; Cipolla *et al.*, 2010). In contrast, in adult Zucker diabetic fatty rats, rosiglitazone
42 did not modify the altered mechanical and structural properties despite the vascular
43 function improvement (Lu *et al.*, 2010). In MRA from 6 month-old SHR, that had been
44 hypertensive for a long time, pioglitazone did not affect the reduced external and
45 internal diameters, the increased wall:lumen ratio and vascular stiffness as well as the
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 altered distensibility. Differences in the time that rats have been hypertensive before
4 treatment, which might result in remodelling variation, as well as in the duration and
5 dosage of treatment, would explain such discrepancies.
6
7

8
9
10 Glitazones improve the impaired endothelium-dependent relaxation (Diep *et al.*,
11 2002; Nakamura *et al.*, 2007; Matsumoto *et al.*, 2008) and reduce vascular contractility,
12 although pioglitazone increased phenylephrine responses in SHR aorta (Llorens *et al.*,
13 2007). In MRA from SHR, pioglitazone treatment slightly improved the impaired
14 acetylcholine-induced vasodilatation. Moreover, the phenylephrine contraction was
15 similar in MRA from WKY and SHR, and remained unmodified after pioglitazone
16 treatment; this result, which agrees to that found in isoproterenol-treated rats (Fukuda *et*
17 *al.*, 2008), apparently excludes an effect of the glitazone on vasoconstrictor responses.
18
19

20
21
22 Decreased vascular PPARs expression might participate in the exacerbated
23 proliferation, migration and inflammation observed in hypertension (Chan *et al.*, 2010;
24 Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Accordingly, MRA from SHR showed lower
25 PPAR γ mRNA levels than WKY. Reduction on PPAR γ might be related with the
26 increased COX-2 expression in SHR, since COX-2 is regulated by transcription factors
27 which activation is reduced by PPAR γ (Touyz & Schiffrin, 2006). Pioglitazone
28 treatment increased MRA PPAR γ levels, similarly to that found using rosiglitazone and
29 pioglitazone in SHR aorta and rostral ventrolateral medulla (Chan *et al.*, 2010; Zhang *et*
30 *al.*, 2010), suggesting that upregulated PPAR γ may contribute to the anti-inflammatory
31 properties of glitazones. Despite this, pioglitazone treatment increased COX-2
32 expression in MRA from SHR. PPAR γ agonists have been shown to decrease (Sánchez-
33 Hidalgo *et al.*, 2005; Collino *et al.*, 2006) but also to increase COX-2 (Meade *et al.*,
34 1999; Ye *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008); the presence of a functional PPAR response
35 element (PPRE) in the promoter region of COX-2 (Meade *et al.*, 1999) would explain
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 this increase. The augmented COX-2 expression after pioglitazone treatment had
4
5 functional consequences since a selective COX-2 inhibitor reduced phenylephrine
6
7 responses, suggesting the involvement of COX-2-derived vasoconstrictor prostanoids
8
9 after pioglitazone treatment.
10
11

12 We then attempted to determine the prostanoid increased after pioglitazone
13
14 treatment. The TP receptor antagonist reduced phenylephrine responses, despite the lack
15
16 of effect of the TXA₂ synthase inhibitor furegrelate, suggesting that prostanoids other
17
18 than TXA₂, by acting on TP receptors, contribute to those responses. These prostanoids
19
20 seem to be mainly of endothelial origin since endothelium removal greatly reduced the
21
22 inhibitory effect of NS 398 and abolished that of SQ 29,548. PGF_{2α}, isoprostanes and
23
24 PGH₂ would induce contraction by activating TP receptors (Félétou *et al.*, 2009). PGF_{2α}
25
26 and 8-isoprostane levels were similar in samples from all groups, discarding the
27
28 involvement of these compounds in the pioglitazone effect. Unfortunately, PGH₂ levels
29
30 are difficult to measure due to its short half-life and still need to be better assessed to
31
32 evaluate more precisely their contribution to vascular responses (Félétou *et al.*, 2009).
33
34
35
36
37

38 Prostacyclin is the main vasodilator prostanoid generated by COX acting on IP
39
40 receptors. However, growing evidences have pointed out PGI₂ as an endothelium-
41
42 derived vasoconstrictor factor able to activate TP receptors in conditions such as
43
44 hypertension or aging (Gluais *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2008;
45
46 Félétou *et al.*, 2009). Accordingly, the prostacyclin analogue iloprost induced a biphasic
47
48 response with greater contractile effect in SHR than WKY, in agreement with reports
49
50 using PGI₂ (Gluais *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2008). Additionally, the vasodilator phase
51
52 was slower in SHR than WKY. Interestingly, pioglitazone treatment did not modify any
53
54 of the two phases. The iloprost-induced vasoconstriction was reduced by the TP
55
56 receptor antagonist in MRA from SHR. Furthermore, the relaxing phase was almost
57
58
59
60

1
2
3 abolished by the IP receptor antagonist but speeded by SQ 29,548 in MRA from both
4
5 treated and untreated SHR, in agreement with Gomez *et al.* (2008), suggesting that
6
7 activation of TP receptors, even by a weak and partial agonist such as PGI₂, can
8
9 markedly blunt vascular relaxation. Whether changes in the expression of receptors
10
11 would explain differences in the iloprost response between WKY and SHR remains
12
13 elusive. Thus, Tang & Vanhoutte (2008) have described that hypertension did not
14
15 modify the genomic expression of both IP and TP receptors, although reduced
16
17 expression of IP receptors in SHR has also been described (Numaguchi *et al.*, 1999). In
18
19 MRA from SHR, TP receptor levels are increased, in agreement with the higher
20
21 contraction to iloprost we found and with the increased response to the thromboxane
22
23 analogue U46619 already described (Xavier *et al.*, 2008). Additionally, the IP receptor
24
25 levels were greater in SHR, despite the slower iloprost-induced vasodilatation.
26
27 Dysfunction of this receptor and possible alterations in the adenylate cyclase pathway
28
29 has been described in SHR (Gluais *et al.*, 2005; Gomez *et al.*, 2008). Furthermore,
30
31 pioglitazone treatment reduced TP and IP receptor levels. In this sense, Sugawara *et al.*
32
33 (2002) described that PPAR γ activation reduced TP gene transcription. Despite the
34
35 reduced receptors expression, the biphasic response to iloprost was similar in MRA
36
37 from pioglitazone-treated and untreated rats. Similar contractile responses to U46619
38
39 were also observed (unpublished results). Differences in the cellular mechanisms from
40
41 the genomic expression to the presence of functional receptors in the membrane would
42
43 explain such discrepancies and further experiments are necessary to clarify them.
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53 Prostacyclin levels after phenylephrine stimulation were lower in samples from
54
55 SHR than WKY, as described (Soma *et al.*, 1985). Interestingly, pioglitazone treatment
56
57 augmented those levels, in agreement to Ye *et al.* (2006), who establish a relationship
58
59 between these increased levels and the protective effect of pioglitazone in myocardial-
60

1
2
3 reperfusion injury. Furthermore, the PGI₂ synthesis inhibitor, but not the IP receptor
4
5 antagonist, reduces phenylephrine response only in segments from pioglitazone-treated
6
7 rats. Overall, these results suggest the involvement of prostacyclin, acting on TP
8
9 receptors, on phenylephrine response after pioglitazone treatment.
10
11

12 Increased O₂⁻ production from different origins, including NADPH oxidase,
13
14 participates in contractile responses in hypertension (Alvarez *et al.*, 2008; García-
15
16 Redondo *et al.*, 2009). Accordingly, greater expression of NOX-1, one the catalytic
17
18 subunit of NADPH oxidase, has been described in SHR (Briones *et al.*, 2011).
19
20 Additionally, reduced antioxidant defences might contribute to the increased oxidative
21
22 stress described in this pathology (Redón *et al.*, 2003). This increased oxidative stress
23
24 would contribute to the altered vascular responses by reducing NO availability (Viridis
25
26 *et al.*, 2009). Our results support this hypothesis since compared to WKY, SHR showed:
27
28 1) greater inhibitory effect of apocynin and allopurinol on phenylephrine responses; 2)
29
30 increased O₂⁻ production and MDA plasma levels; 3) increased NOX-1 mRNA levels;
31
32 4) reduced Cu/Zn-, Mn- and EC-SOD expression, while the catalase levels were similar
33
34 in both strains; 5) lower leftward shift of phenylephrine-response curve after NO
35
36 inhibition. Glitazones reduce oxidative stress by inhibition of NADPH oxidase activity
37
38 (Bagi *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2005), contributing to its anti-inflammatory effect and
39
40 protecting against hypertension-induced cerebrovascular injury (Nakamura *et al.*, 2007).
41
42 In our conditions pioglitazone treatment also displayed antioxidant properties since: 1)
43
44 abolished the apocynin and allopurinol effects on phenylephrine response; 2)
45
46 normalized the increased O₂⁻ production, and 3) reduced the NOX-1, NOX-2 and
47
48 p47phox mRNA levels. Moreover, despite no effect on Cu/Zn- and Mn-SOD and the
49
50 decreased EC-SOD, catalase mRNA levels were increased by pioglitazone treatment, in
51
52 agreement with Bagi *et al.* (2004), and would be explained by the existence of a PPRE
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 in the catalase promoter region (Girnun *et al.*, 2002). Apocynin might reduce ROS
4
5 availability through its antioxidant properties independent of NADPH oxidase inhibition
6
7 (Heumuller *et al.*, 2008); of interest, we found increased ROS production in SHR that
8
9 was reduced by pioglitazone treatment, although we do not know the exact mechanism
10
11 of apocynin in our conditions.
12
13

14
15 The antioxidant capacity of glitazones might have a very important functional
16
17 consequence which is the increased NO availability. The effects of glitazone on NO
18
19 generation are unclear. While some studies find increased NO release and/or NO
20
21 synthase activity by glitazones (Calnek *et al.*, 2003; Wakino *et al.*, 2005; Llorens *et al.*,
22
23 2007), others find no effect (Ye *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). As mentioned,
24
25 pioglitazone treatment restored the impaired acetylcholine-induced vasodilatation and
26
27 L-NAME greatly potentiated phenylephrine responses without affecting eNOS protein
28
29 expression. Similarly, Calnek *et al.* (2003) showed increased NO release by endothelial
30
31 cells without increased eNOS mRNA or protein levels.
32
33
34

35
36 In conclusion, pioglitazone treatment, although does not have antihypertensive
37
38 effects, modifies the levels of different mediators involved in phenylephrine response in
39
40 resistance arteries. Thus, increased PGI₂ production, likely from increased COX-2, was
41
42 observed. Although in our experimental conditions PGI₂ seems to act as vasoconstrictor,
43
44 increased levels of this prostanoid would be beneficial because their important
45
46 cardioprotective role through inhibition of platelet aggregation and the pleiotropic
47
48 effects on vascular smooth muscle. Further investigations are needed to address this
49
50 issue. In addition, the reduction of oxidative stress, that can increase NO bioavailability,
51
52 would also contribute to the protective effect of glitazones widely reported in several
53
54 pathologies.
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

This study was supported by Fundación Mutua Madrileña, Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-07201) and Instituto de Salud Carlos III (Red RECAVA, RD06/0014/0011) and Sociedad Española de Farmacología-Almirall Prodesfarma. AMB is supported by the Ramon y Cajal program (RYC-2010-06473) from MICINN.

For Peer Review

References

Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M (2005). Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* 23: 767-777.

Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A *et al.* (2007). Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 381-388.

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M (2008). Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 153: 926-935.

Arribas SM, Hillier C, González C, McGrory S, Dominiczak AF, McGrath JC (1997). Cellular aspects of vascular remodeling in hypertension revealed by confocal microscopy. *Hypertension* 30: 1455-1464.

Bagi Z, Koller A, Kaley G (2004). PPAR γ activation, by reducing oxidative stress, increases NO bioavailability in coronary arterioles of mice with Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H742-H748.

Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Tovar S, Vila E, Salaices M (2002). Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. *Life Sci* 71: 1997-2014.

Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E *et al.* (2003). Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* 552: 185-195.

1
2
3 Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y *et al.* (2011).
4
5 Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from
6
7 WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens* 5: 137-153.
8
9

10
11 Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM (2003). Peroxisome proliferator-
12
13 activated receptor γ ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells.
14
15 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 52-57.
16
17

18
19 Chan SH, Wu KL, Kung PS, Chan JY (2010). Oral intake of rosiglitazone promotes a
20
21 central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated
22
23 receptor- γ and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of
24
25 spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 55: 1444-1453.
26
27

28
29 Chen R, Liang F, Moriya J, Yamakawa J, Takahashi T, Shen L *et al.* (2008).
30
31 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their agonists for hypertension
32
33 and heart failure: are the reagents beneficial or harmful? *Int J Cardiol* 130: 131-139.
34
35

36
37 Cipolla MJ, Bishop N, Vinke RS, Godfrey JA. (2010). PPAR γ activation prevents
38
39 hypertensive remodeling of cerebral arteries and improves vascular function in female
40
41 rats. *Stroke* 41: 1266-1270.
42
43

44
45 Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C *et al.* (2006).
46
47 Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR- γ agonists in
48
49 the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol* 530:
50
51 70-80.
52
53

54
55 Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A *et al.* (2002).
56
57 Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of
58
59 angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ .
60
61 *Circulation* 105: 2296-2302.

1
2
3 Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK
4
5 *et al.* (2005). Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2
6
7 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In
8
9 macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 366: 1279-1289.

12
13 Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM (2009). Endothelium-dependent contractions
14
15 in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol* 156: 563-574.

18
19 Fukuda LE, Davel AP, Verissimo-Filho S, Lopes LR, Cachofeiro V, Lahera V *et al.*
20
21 (2008). Fenofibrate and pioglitazone do not ameliorate the altered vascular reactivity in
22
23 aorta of isoproterenol-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 413-421.

26
27 García-Redondo AB, Briones AM, Avendaño MS, Hernanz R, Alonso MJ, Salaices M
28
29 (2009). Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen
30
31 peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. *J Hypertens* 27: 1814-1822.

33
34 Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME (2002). Identification of a functional
35
36 peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase
37
38 promoter. *Mol Endocrinol* 16: 2793-2801.

41
42 Gluais P, Lonchamp M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. (2005). Acetylcholine-
43
44 induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of
45
46 prostacyclin. *Br J Pharmacol* 146: 834-845.

48
49 Gomez E, Schwendemann C, Roger S, Simonet S, Paysant J, Courchay C *et al.* (2008).
50
51 Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. *Am J*
52
53 *Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2198-H2211.

56
57 Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM (2005).
58
59 Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands regulate endothelial membrane
60
superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C899-C905.

1
2
3 Heumüller S, Wind S, Barbosa-Sicard E, Schmidt HH, Busse R, Schröder K, *et al.*
4
5 (2008). Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant.
6
7 Hypertension 51: 211-217.
8
9

10
11 Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q *et al.* (2002).
12
13 Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. Hypertension 40: 687-
14
15 693.
16
17

18
19 Kang YJ, Kim HS, Choi HC (2008). Troglitazone increases IL-1 β induced
20
21 cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression via enhanced
22
23 phosphorylation of I κ B α in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and
24
25 spontaneously hypertensive rats. Biol Pharm Bull 31: 1955-1958.
26
27

28
29 Ledingham JM, Lavery R (2005). Effects of glitazones on blood pressure and vascular
30
31 structure in mesenteric resistance arteries and basilar artery from genetically
32
33 hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 32: 919-925.
34
35

36
37 Leff T, Mathews ST, Camp HS (2004). Review: peroxisome proliferator-activated
38
39 receptor- γ and its role in the development and treatment of diabetes. Exp Diabetes Res
40
41 5: 99-109.
42
43

44
45 Li R, Zhang H, Wang W, Wang X, Huang Y, Huang C *et al.* (2010). Vascular insulin
46
47 resistance in prehypertensive rats: role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling. Eur J
48
49 Pharmacol 628: 140-147.
50
51

52
53 Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-
54
55 time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. Methods 25: 402-408.
56
57

58
59 Llorens S, Mendizabal Y, Nava E (2007). Effects of pioglitazone and rosiglitazone on
60
aortic vascular function in rat genetic hypertension. Eur J Pharmacol 575: 105-112.

1
2
3 Lu X, Guo X, Karathanasis SK, Zimmerman KM, Onyia JE, Peterson RG *et al.* (2010).
4
5 Rosiglitazone reverses endothelial dysfunction but not remodeling of femoral artery in
6
7 Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Diabetol* 9: 19.

8
9
10
11 Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K (2008). Relationships among ET-1, PPAR γ ,
12
13 oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic animals. *J Smooth Muscle Res*
14
15 44: 41-55.

16
17
18
19 Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999). Peroxisome
20
21 proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274:
22
23 8328-8334.

24
25
26 Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF *et al.*
27
28 (2007). Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone
29
30 spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke* 38: 3016-
31
32 3022.

33
34
35
36 Numaguchi Y, Harada M, Osanai H, Hayashi K, Toki Y, Okumura K *et al.* (1999).
37
38 Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the
39
40 thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 41: 682-688.

41
42
43
44 Paravicini TM, Touyz RM (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71:
45
46 247-258.

47
48
49 Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A *et al.* (2003). Antioxidant
50
51 activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 41:
52
53 1096-1101.

54
55
56
57 Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, Alarcón De La Lastra C (2005).
58
59 Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces
60
chronic colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol* 69: 1733-1744.

1
2
3 Sarafidis PA, Nilsson PM (2006). The effects of thiazolidinediones on blood pressure
4 levels - a systematic review. *Blood Press* 15: 135-150.
5
6

7
8 Savoia C, Schiffrin EL (2007). Vascular inflammation in hypertension and diabetes:
9 molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond)* 112: 375-384.
10
11

12
13 Shinzato T, Ohya Y, Nakamoto M, Ishida A, Takishita S (2007). Beneficial effects of
14 pioglitazone on left ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *Hypertens*
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Res 30: 863-873.

Soma M, Manku MS, Jenkins DK, Horrobin DF (1985). Prostaglandins and
thromboxane outflow from the perfused mesenteric vascular bed in spontaneously
hypertensive rats. *Prostaglandins* 29: 323-333.

Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Ikeda Y, Sato K, Taniyama Y *et al.* (2002).
Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferator-
activated receptor-gamma via an interaction with Sp1 in vascular smooth muscle cells. *J*
Biol Chem 277: 9676-9683.

Tang EH, Vanhoutte PM. (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in
endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by
aging and hypertension. *Physiol Genomics* 32: 409-418.

Touyz RM, Schiffrin EL (2006). Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular
biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 45: 19-28.

Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L *et al.* (2009).
Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously
hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids.
Hypertension 53: 1008-1016.

1
2
3 Wakino S, Hayashi K, Tatematsu S, Hasegawa K, Takamatsu I, Kanda T *et al.* (2005).
4
5 Pioglitazone lowers systemic asymmetric dimethylarginine by inducing
6
7 dimethylarginine dimethylaminohydrolase in rats. *Hypertens Res* 28: 255-262.
8
9

10
11 Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, del Campo L, Salaices M, Rossoni LV *et al.*
12
13 (2008). Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from
14
15 normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A₂ and prostacyclin. *Br*
16
17 *J Pharmacol* 154: 1225-1235.
18
19

20
21 Ye Y, Lin Y, Atar S, Huang MH, Perez-Polo JR, Uretsky BF *et al.* (2006). Myocardial
22
23 protection by pioglitazone, atorvastatin, and their combination: mechanisms and
24
25 possible interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1158-H1169.
26
27

28
29 Zhang L, Xie P, Wang J, Yang Q, Fang C, Zhou S *et al.* (2010). Impaired peroxisome
30
31 proliferator-activated receptor- γ contributes to phenotypic modulation of vascular
32
33 smooth muscle cells during hypertension. *J Biol Chem* 285: 13666-13677.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Figure 1. External and internal diameter-intraluminal pressure (A, B) and wall:lumen-intraluminal pressure (C) in MRA from WKY rats and SHR untreated or treated with pioglitazone incubated in 0Ca^{2+} -KHS. (D) Representative transversal confocal projections of the vascular wall of MRA from WKY, SHR and pioglitazone-treated SHR. Vessels were pressure-fixed at 70 mmHg, stained with Hoechst 33342 and mounted intact on a slide. Projections were obtained from serial optical sections captured with a fluorescence confocal microscope (x63_{oil} immersion objective, zoomX2). Metamorph Image Analysis software was used to produce the transversal projection of the artery. Stress-strain relationship (E) and incremental distensibility-intraluminal pressure curves (F) in MRA from WKY, SHR and pioglitazone-treated SHR rats. * $P < 0.05$ vs WKY rats by two-way ANOVA and Bonferroni post-test. $n = 8$ -9 animals. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 2. (A) Quantitative RT-PCR assessment of PPAR γ mRNA levels in mesenteric arteries from WKY rats and SHR untreated and treated with pioglitazone. (B) Representative Western blot with densitometric analysis for the inducible isoform of cyclooxygenase (COX-2) protein expression (upper panel) and quantitative RT-PCR assessment of COX-2 mRNA levels (lower panel) in arteries from WKY rats and SHR untreated and treated with pioglitazone. * $P < 0.05$ vs WKY rats, # $P < 0.05$ vs untreated SHR by Student's t test. $n = 5$ -12 animals. Data are expressed as mean \pm SEM.

Figure 3. (A) Concentration-response curve to phenylephrine (Phe) in endothelium-intact (E+) MRA from WKY rats and SHR untreated or treated with pioglitazone. Effect of 1 μM NS 398 on the response to Phe in endothelium-intact (E+) MRA from WKY rats (B) and SHR untreated (C) or treated with pioglitazone (D) and in

1
2
3 endothelium-denuded segments (E-) of MRA from pioglitazone-treated SHR (E). * $P <$
4 0.05 vs control by two-way ANOVA and Bonferroni post-test. $n = 6-10$ animals. Data
5 are expressed as mean \pm SEM.
6
7
8
9

10
11 **Figure 4.** Effect of 10 μ M SC 19220, 1 μ M SQ 29,548, 1 μ M furegrelate, 10 μ M
12 tranylcypromine, 1 μ M RO 1138452 and the combination of SQ 29,548 and RO
13 1138452 on the concentration-response curve to phenylephrine (Phe) in endothelium-
14 intact (E+) MRA from SHR treated with pioglitazone and effect of 1 μ M SQ 29,548 on
15 the response to Phe in endothelium-denuded segments (E-) of MRA from SHR treated
16 with pioglitazone. * $P < 0.05$ vs control by two-way ANOVA and Bonferroni post-test.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 5. (A) Levels of 6-keto-PGF_{1 α} in the incubation medium after completion of the
phenylephrine concentration-response curve in MRA from WKY rats and SHR
untreated and treated with pioglitazone. (B) Representative record of the biphasic
response elicited by iloprost (1 μ M) in MRA precontracted with phenylephrine (Phe).
(C) Contractile phase of the response to iloprost in MRA from WKY rats and SHR
untreated or treated with pioglitazone and effect of 1 μ M SQ 29,548, 1 μ M RO 1138452
and 10 μ M SC 19220 on the contraction induced by iloprost in pioglitazone-treated
SHR. (D) Vasodilator phase of the response induced by iloprost in MRA from WKY
rats and SHR untreated or treated with pioglitazone and effect of SQ 29,548, RO
1138452 and SC 19220 on the relaxation induced by iloprost in pioglitazone-treated
SHR. (E) Quantitative RT-PCR assessment of TP and IP receptor mRNA levels in
arteries from WKY rats and SHR untreated and treated with pioglitazone. * $P < 0.05$ vs
WKY rats or vs control, # $P < 0.05$ vs SHR untreated rats by Student's t -test or by two-

1
2
3 way ANOVA and Bonferroni post-test. $n = 5-7$ animals. Data are expressed as mean \pm
4
5 SEM.
6

7
8
9 **Figure 6.** (A) Effect of 0.3 mM apocynin and 0.3 mM allopurinol on the concentration-
10 response curve to phenylephrine (Phe) in MRA from WKY rats and SHR untreated and
11 treated with pioglitazone. $*P < 0.05$ vs control by two-way ANOVA and Bonferroni
12 post-test. $n = 7-12$ animals. (B) Representative fluorescent photomicrographs of
13 confocal microscopic sections of MRA from WKY rats and SHR untreated and treated
14 with pioglitazone. Vessels were labelled with the oxidative dye dihydroethidium. Image
15 size $375 \times 375 \mu\text{m}$. (C) Quantitative RT-PCR assessment of vascular NOX-1 mRNA
16 levels and (D) plasma MDA levels in WKY rats and SHR untreated and treated with
17 pioglitazone. $*P < 0.05$ vs WKY rats, $^{\#}P < 0.05$ vs SHR untreated rats by Student's t -
18 test. $n = 5-9$ animals. Data are expressed as mean \pm SEM.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33
34 **Figure 7.** (A) Representative Western blot and densitometric analysis for Cu/Zn-, Mn-
35 and EC-SOD protein expression and (B) quantitative RT-PCR assessment of catalase
36 mRNA levels in mesenteric arteries from WKY rats and SHR untreated and treated
37 with pioglitazone. $*P < 0.05$ vs WKY rats, $^{\#}P < 0.05$ vs SHR untreated rats by
38 Student's t -test. $n = 5-6$ animals. Data are expressed as mean \pm SEM.
39
40
41
42
43
44
45

46
47 **Figure 8.** (A) Effect of 0.1 mM L-NAME on the concentration-response curve to
48 phenylephrine (Phe) in WKY rats and SHR untreated and treated with pioglitazone. $*P$
49 < 0.05 vs control by two-way ANOVA and Bonferroni post-test. $n = 6-7$ animals. (B)
50 Representative Western blot and densitometric analysis for eNOS protein expression in
51 mesenteric arteries from SHR untreated and treated with pioglitazone. $n = 5-6$ animals.
52 Data are expressed as mean \pm SEM.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Conflicts of interest**
4

5
6 None
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

List of non-standard abbreviations:

COX-2: cyclooxygenase-2; dAUC, differences of area under the concentration-response curves; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; KHS, Krebs Henseleit solution; L-NAME, N-nitro-L-arginine methyl ester; MDA, malondialdehyde; MRA, mesenteric resistance arteries; NO, nitric oxide; NS 398, N-(2-Cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)-Methanesulfonamide; O_2^- , superoxide anion; PGI₂, prostacyclin; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptors γ ; RO 1138452, 1H-Imidazol-2-amine,4,5-dihydro-N-[4-[[4-(1-methylethoxy)phenyl]methyl]phenyl]; ROS, reactive oxygen species; SC 19220, 8-chloro-dibenz[b,f][1,4]oxazepine-10(11H)-carboxy-(2-acetyl)hydrazide; SHR, spontaneously hypertensive rats; SOD, superoxide dismutase; SQ 29,548, [1S-[1 α , 2 α (Z),3 α ,4 α]]-7-[3-[[2-[(phenylamino)carbonyl]hydrazino]methyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5 heptenoic acid; VSMC, vascular smooth muscle cells; WKY, Wistar Kyoto.

Table 1. Differences of area under the concentration-response curves to phenylephrine (dAUC) between control and experimental situations in endothelium-intact (E+) mesenteric resistance arteries from WKY rats and SHR untreated or treated with pioglitazone and in endothelium-denuded segments (E-) of arteries from pioglitazone-treated SHR. AUCs were calculated from the individual concentration-response curve plots using a computer program (GraphPad Prism Software); the differences were expressed as a percentage of the AUC of the corresponding control situation.

	WKY E+	SHR E+	SHR+Pio	
			E+	E-
NS	~ 0	~ 0	34.5 ± 6.9 [#]	13.2 ± 3.7 ⁺
SQ 29,548		~ 0	19.5 ± 3.1 [#]	~ 0 ⁺
SC 19220		~ 0	~ 0	
RO 1138452			~ 0	
SQ 29,548 + RO 1138452			23.5 ± 5.8	
Furegrelate		~ 0	~ 0	
Tranlycypromine		~ 0	16.0 ± 1.6 [#]	
Apocynin	14.2 ± 4.2	29.3 ± 4.3*	~ 0 [#]	
Allopurinol	~ 0	15.0 ± 2.2*	~ 0 [#]	
L-NAME	51.9 ± 5.4	32.4 ± 4.9*	53.6 ± 4.2 [#]	

■ Not determined

* $P < 0.05$ vs WKY rats, [#] $P < 0.05$ vs SHR untreated rats, ⁺ $P < 0.05$ vs endothelium-intact arteries by Student's *t*-test. $n = 5-10$ animals. Data are expressed as mean ± SEM.

Figure 1

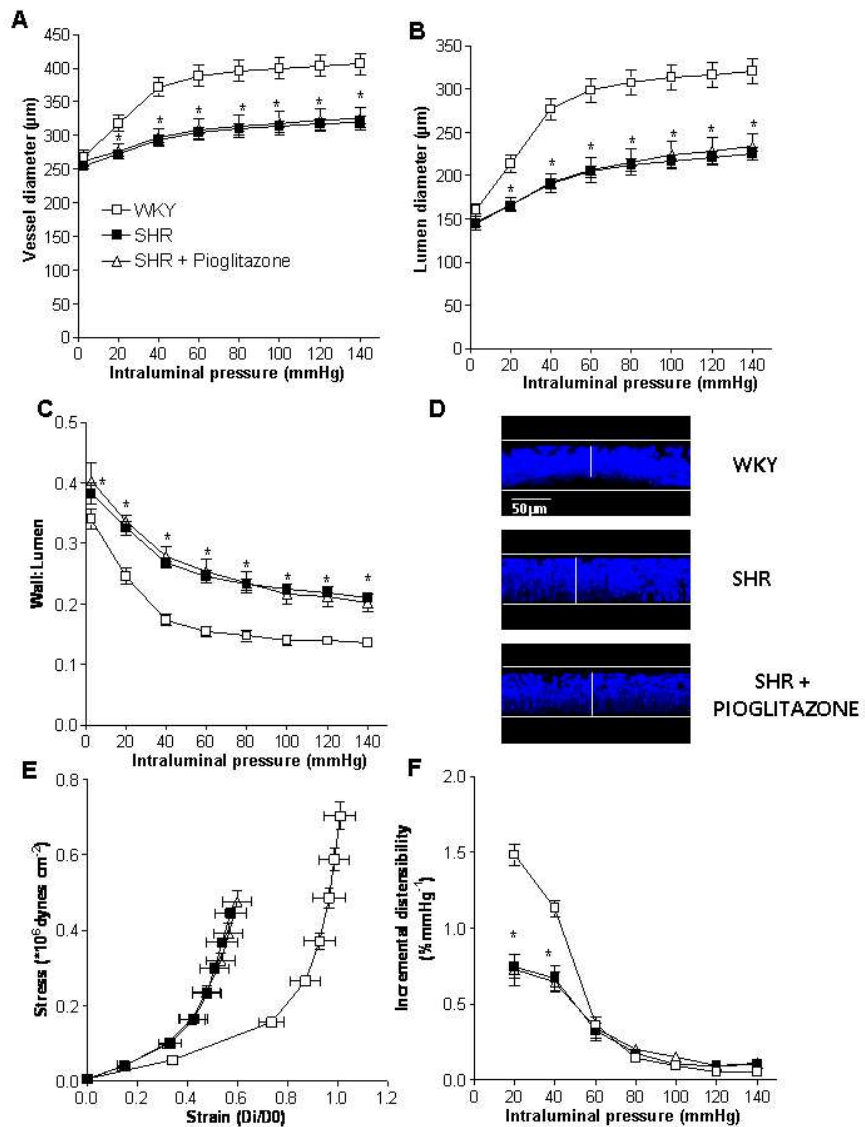
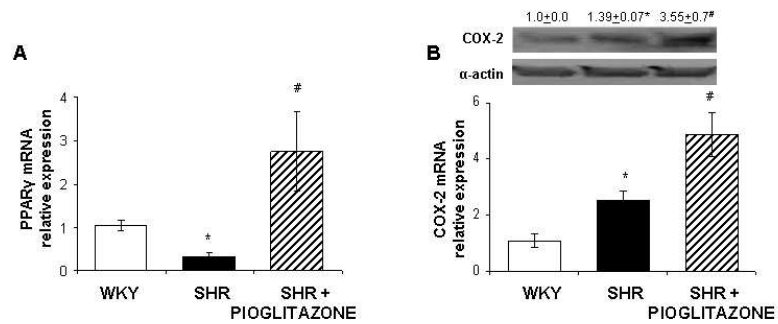


Figure 1
190x254mm (96 x 96 DPI)

Figure 2

Figure 2
254x190mm (96 x 96 DPI)

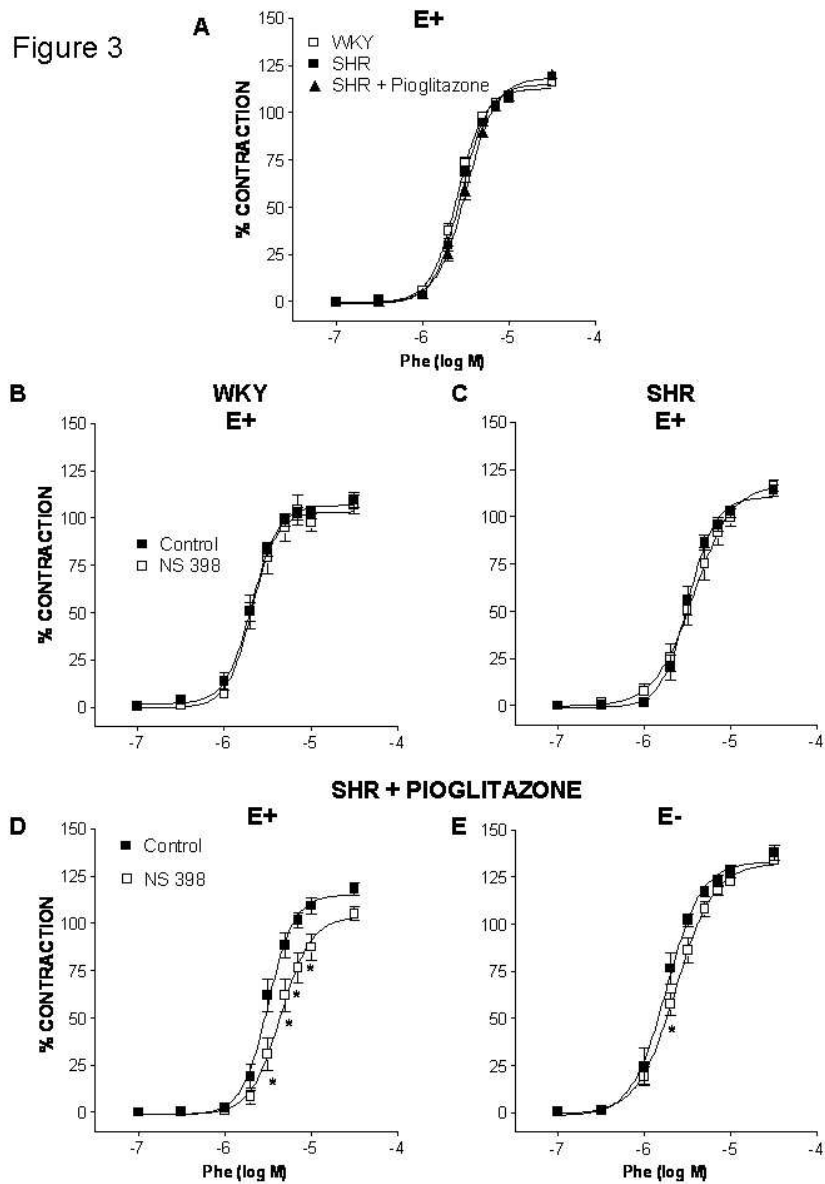


Figure 3
190x254mm (96 x 96 DPI)

Figure 4

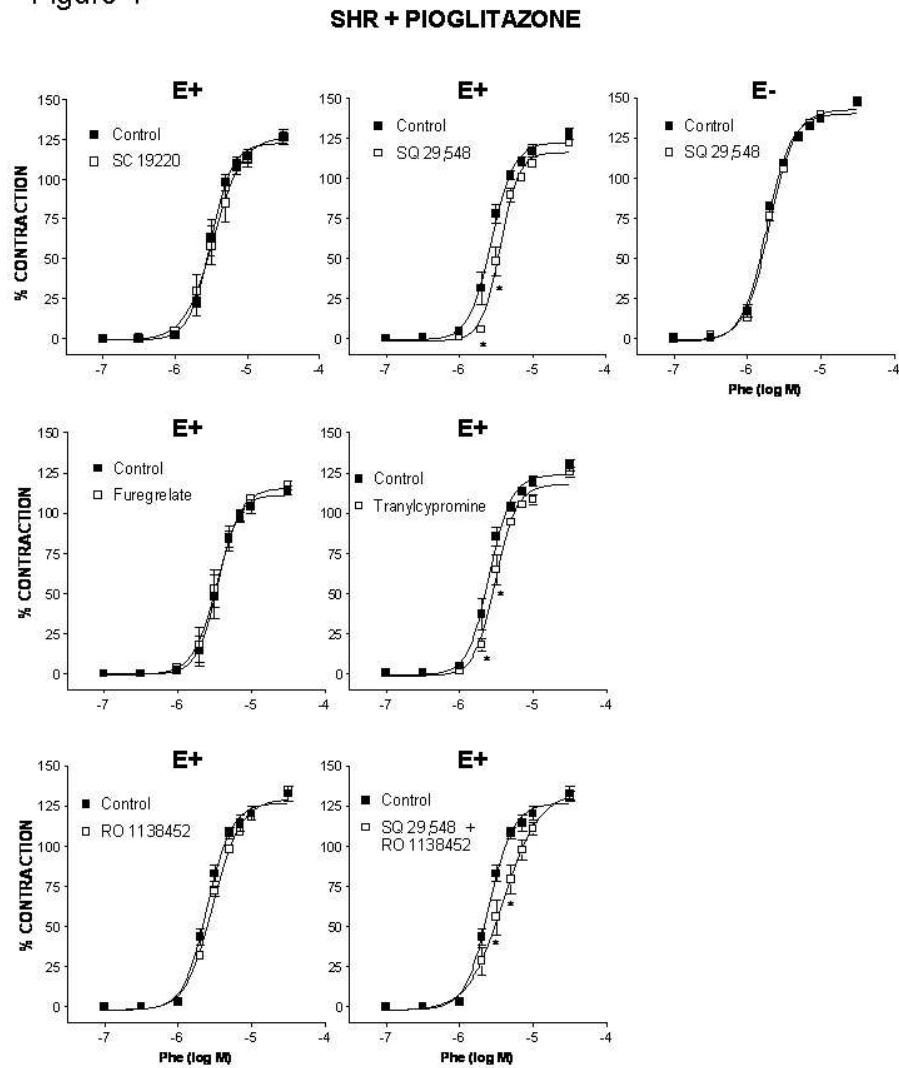


Figure 4
190x254mm (96 x 96 DPI)

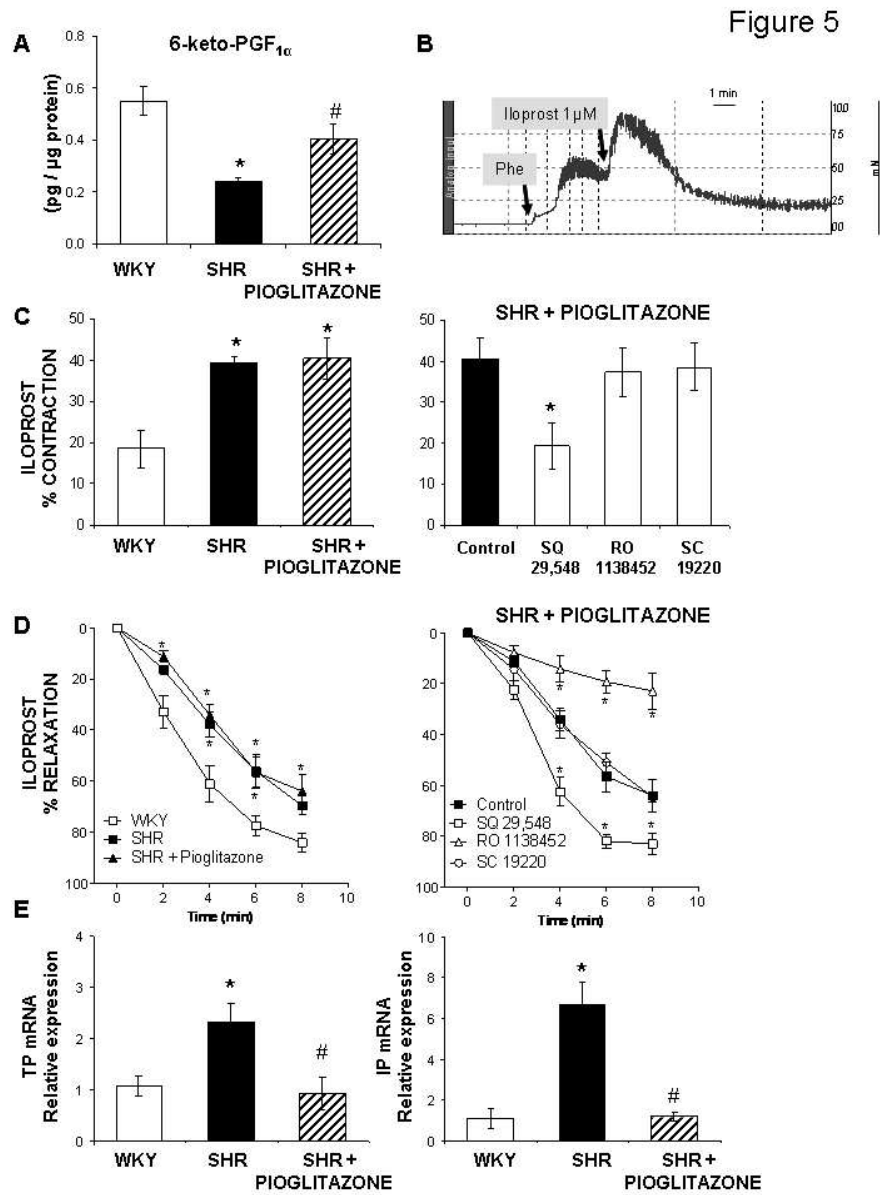


Figure 5
190x254mm (96 x 96 DPI)

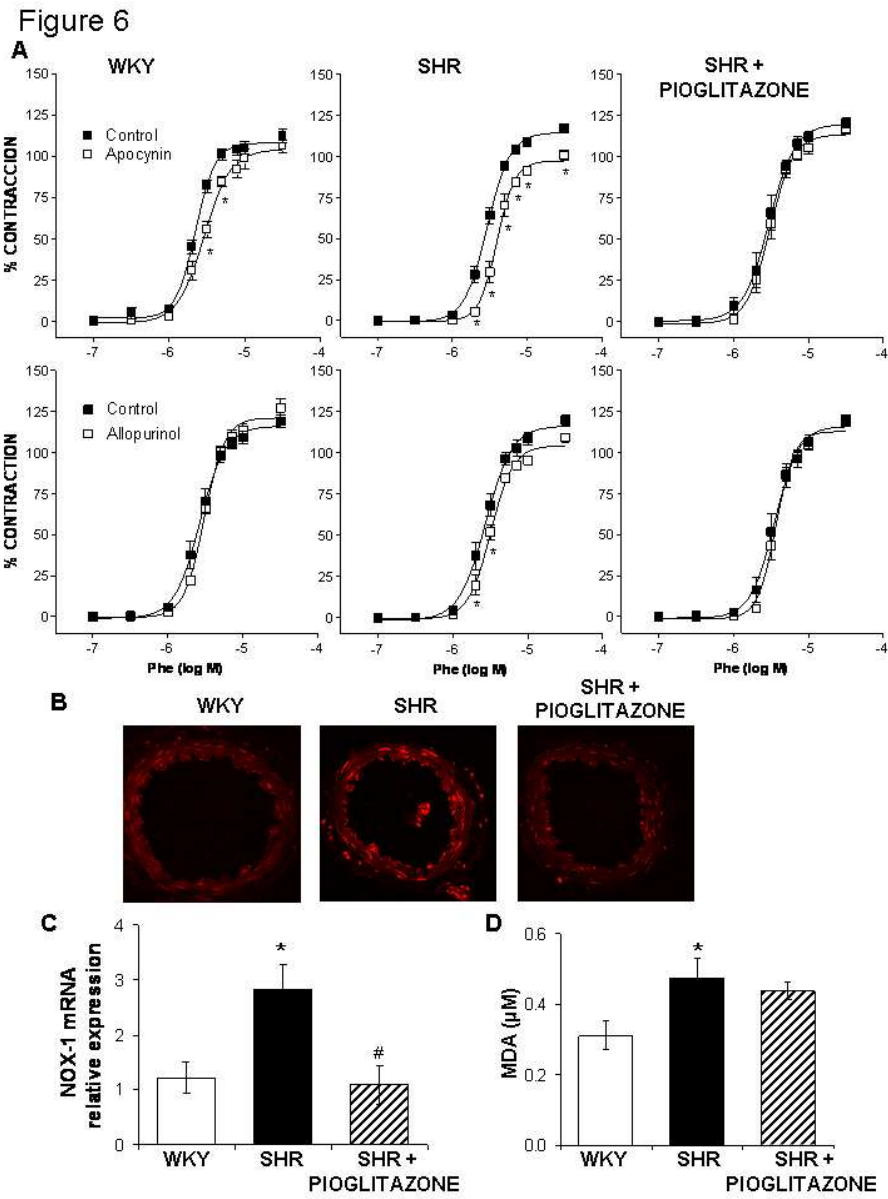


Figure 6
190x254mm (96 x 96 DPI)

Figure 7

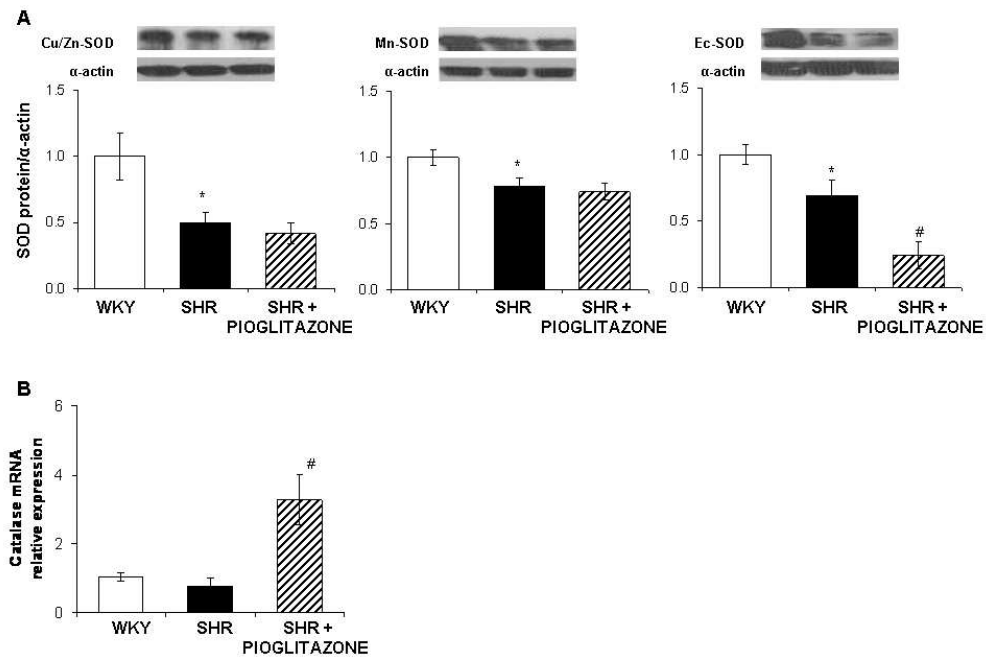
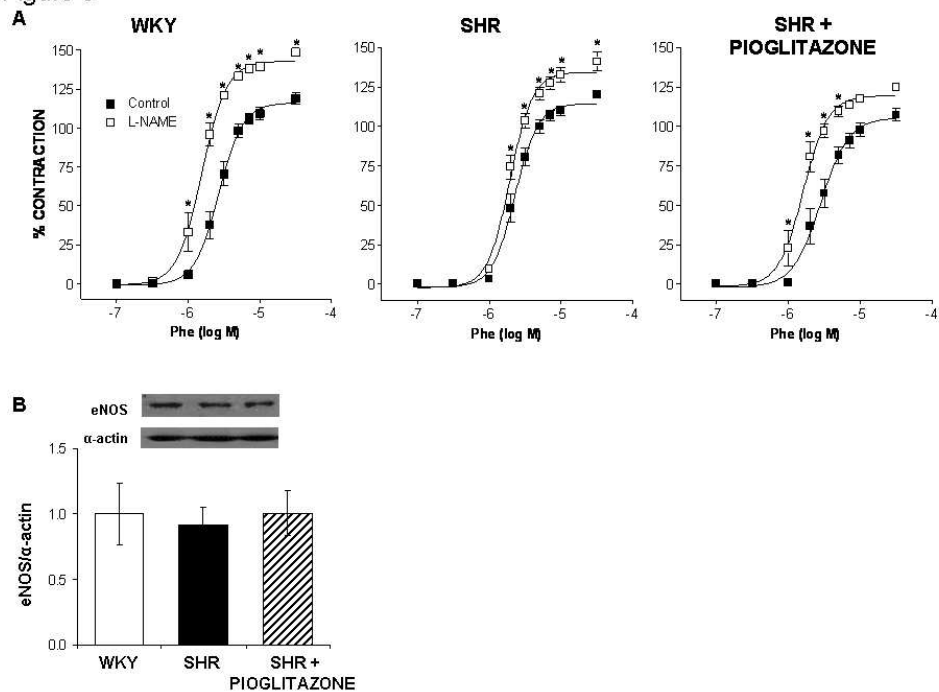
Figure 7
254x190mm (96 x 96 DPI)

Figure 8

Figure 8
254x190mm (96 x 96 DPI)

