Departamento Ciencias de la Salud III
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos

REGULACIÓN POR PPARγ DE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE COX-2 ASOCIADA A LA RESPUESTA INFLAMATORIA CON LA HIPERTENSIÓN

TESIS DOCTORAL

José Vicente Pérez Girón
2009

Departamento Ciencias de la Salud III
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Rey Juan Carlos

María Jesús Alonso Gordo, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Ciencias de la Salud III de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos, Mercedes Salaices Sánchez, Catedrática del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Manuel Ros Pérez, Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Salud III de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos,

CERTIFICAN:

Que Don José Vicente Pérez Girón, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**Regulación por PPARγ de la expresión vascular de COX-2 asociada a la respuesta inflamatoria con la hipertensión**" con objeto de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a 14 de Marzo de 2008.

Dra. María Jesús Alonso Gordo

Dra. Mercedes Salaices Sánchez

Dr. Manuel Ros Pérez

Este trabajo ha sido realizado con ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF: 2006-02376), Instituto de Salud Carlos III (PI041917), Red Temática de Enfermedades Cardiovasculares (RECAVA RD06/0014/0011) 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). José Vicente Pérez Girón ha sido becario de la Universidad Rey Juan Carlos.

"Cuando tengas que elegir entre dos caminos, pregúntate cual de ellos tiene corazón. Quien elige el camino del corazón no se equivoca nunca"

Popol Wuj

"A la voluntad, mas que a la inteligencia, se enderezan los consejos"

Santiago Ramon y Cajal

"Si es menester hacer algo, hágalo el hombre; póngase a ello con todo empeño. El peregrino negligente no hace sino esparcir más el polvo de sus pasiones"

El Dhammapada

A ti Abuelo.

Allí donde estés

Agradecimientos

Una pregunta realizada por mi supervisora la Doctora María Jesús Alonso me ha acompañado a lo largo de la escritura de esta tesis. La pregunta no era otra que cuando iba a empezar a escribir los agradecimientos y la respuesta siempre era la misma: una vez finalizada toda la escritura. La razón de esta decisión era poder tener la mente fría para con el corazón caliente, echar la vista atrás y recordar como si fuera hoy todas las experiencias vividas desde el comienzo de mi "andadura" científica. Pues bien, ese momento ha llegado. Después de hacer balance, he llegado a la conclusión que esas experiencias han sido muchas y buenas y si a alguien se las debo, es a todos las personas que han sido excelentes compañeros de viaje. Durante los 5 años que ha tardado en realizarse este trabajo mucha gente ha entrado y salido de mi vida, pero todos y cada uno de ellos han dejado en mayor o menor medida su marca. Tanto a nivel personal como a nivel científico muchas personas me han dado más de lo que ellas mismas se puedan imaginar y, aunque no sean conscientes, todas siguen y seguirán dentro de mi corazón durante el resto de mi vida. Por todo lo que estas personas me han aportado, sería injusto no reconocer su aportación a este trabajo.

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a la Dra. María Jesús Alonso, todo el trabajo realizado durante la supervisión de esta tesis. Como ya le dije una vez, la considero mi madre científica y sin su orientación, minuciosidad y sin todas esas "broncas" cariñosas habría sido imposible llegar al punto en el que estoy hoy. Fuera del ámbito científico, le agradezco toda la capacidad humana y comprensión de la que ha hecho gala durante todo el proceso de supervisión de este trabajo. Aunque creo que ella ya lo sabe, no puedo dejar de decir que no olvidaré nunca todo lo que ha hecho por mí y que siempre ha tenido y tendrá un hueco en mi corazón. Muchas gracias también a la Dra. Mercedes Salaices por todo el apoyo mostrado durante estos años, por todo su asesoramiento científico y sobre todo por su capacidad para no perder la sonrisa ante ninguna adversidad y además ser capaz de infundir la confianza que en ocasiones te falta. Gracias también al Dr. Manuel Ros por que me acogió en esta casa y siempre me mostró su apoyo. Muchas gracias por la sinceridad que siempre me ha mostrado, por los consejos que me ha dado a lo largo de este tiempo y por último, pero no menos importante, por hacerme ver "El padrino" con otros ojos.

Gracias a todos los compañeros, pasados y presentes, que han compartido el día a día conmigo en el laboratorio de Fisiología Humana y Bioquímica de la URJC y de los cuales he tenido la suerte de aprender algo nuevo cada día.

Gracias a la Dra. Custodia García por esas "collejas" que me hacían despertar cada mañana. Al Dr. Oscar de Luis, por ser el "gran hacedor de orden" y facilitar las tareas docentes desempeñadas durante la realización de esta tesis, además de por toda la buena voluntad y sentido del humor que ha mostrado desde que le conozco. Al Dr. Antonio Coloma por la buena disposición que ha mostrado siempre para ayudarme, por su contagioso optimismo y por todo el asesoramiento científico prestado. A la Doctora Maria Teresa Fernández por todo el asesoramiento técnico, el buen trato que me ha dado desde mi llegada A Miriam, porque desde que llegué ha sido un espejo en el que mirarme. A Adriana por su sonrisa perpetua y su gran animosidad. A Raquel por la inestimable ayuda prestada para el desarrollo de esta tesis. A Mayte por su capacidad para transmitir tranquilidad y sosiego en situaciones que las requerían. A Jose Manuel por las risas que nos hemos "echado" mientras ejercíamos de centinelas del laboratorio y por mostrame la luz confiándome su doctrina de la "doctorina". A Nuria por todo el sentido del humor y paciencia que ha mostrado desde su llegada a esta casa. A Ana Chocarro para que se arme de valor e infundirle ánimo para cuando ella llegue a este punto. En último lugar, pero no menos importante, a Ángela Martín Cortés. Sin

ella, este trabajo no hubiera sido posible. Gracias por darme tu ayuda siempre que la solicité, por poner tu oreja cuando la necesitaba y por aguantarme cuando he sido inaguantable. A pesar de ser un poco "cascarrabias", tienes un lugar preferente en esta tesis y en mi corazón. Gracias también a Lucía y a Aurelio porque a pesar de no estar ya en el laboratorio, también han dejado su huella tanto a nivel científico como personal y, por lo tanto, en este trabajo.

Me gustaría agradecer al Doctor José Antonio Mas su aportación tanto personal como científica. Sin este "gran maestro", nunca habría aprendido todo lo que se. Gracias por todo el tiempo que has dedicado de forma altruista a mi formación, por los "piques" futboleros de cada lunes, por el increíble carácter y forma de ser que tienes y, sobre todo, por tu amistad. Gracias también a Verónica y Mari Jose, técnicos de la Unidad de Genómica del C.A.T. de la URJC, por aguantarme y soportar todas mis bromas con un gran sentido del humor durante mis múltiples asentamientos en su laboratorio.

Agradezco también a los técnicos Eva Oliveros e Ismael Velasco, por toda la ayuda prestada, los consejos dados y las risas echadas desde mi llegada.

No puedo olvidarme de todas mis compañeras del L-4 de la Facultad de Medicina de la UAM, las cuales han colaborado activamente en el desarrollo de este trabajo, mostrándose siempre como excelentes amigas y compañeras de viaje. Muchas gracias a la Dra. Ana Briones, por todas las conversaciones que tuvimos y los consejos que me dio cuando más lo necesitaba y que nunca olvidaré, además de por todo el conocimiento que he recibido de ella durante este tiempo. Gracias a Anita, porque siempre ha estado ahí y por las discusiones metafísicas sobre el sentido de la vida en las que nos enrolábamos; empezamos juntos y juntos acabamos. Gracias a Amada y a Marta por que sin su experiencia en cultivos celulares no habríamos llegado a este punto. Gracias a Yoly, porque a pesar de que no sigue en el L-4, su presencia aún se nota. Me gustaría agradecer su trabajo, ya que dio pie al mio, la sonrisa que nos regalaba todos los días y toda la alegria y entusiasmo que contagió a su alrededor durante su estancia en el L-4. Me gustaría también mostrar mi agradecimiento a las últimas incorporaciones del L-4 Marisol Avendaño y María, porque aunque haya coincidido poco tiempo con ellas, siempre me he han hecho sentirme agusto a su lado.

Me gustaría también expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Dalton Vasallo y a la Dra. Luciana Rossoni, al igual que a todos los colaboradores que han formado parte de la "comitiva brasileña" que ha pasado por el L-4. Gracias a Giulia, Franck, Fernanda, Alexandra, Karina y Fabiano, por compartir ratos inolvidables, postres maravillosos y por desvelarnos el secreto de la caipirinha.

Agradecer también al Dr. Bart Staels la oportunidad que me dio de trabajar en el Instituto Pasteur de Lille, donde adquirí una gran cantidad de conocimientos y experiencias humanas que jamás olvidaré. Sobre todo, muchas gracias a la Dra. Corine Glineur por la confianza y afecto que me brindó, por enseñarme que es amar la ciencia y por todas las sonrisas con las que ponía punto y final a nuestras disquisiciones. Gracias también a Benoit Pourcet, Ahmin Bouhlel y a la Dra. Giulia Chinetti, todos ellos compañeros inolvidables que compartieron conmigo mi experiencia en Lille y que siempre se mostraron solícitos a ayudarme y a sentirme como en casa.

Me gustaría también mostrar mi agradecimiento a las nuevas incorporaciones del laboratorio de Fisiología y Bioquímica Humana de la URJC Daniel y Roberto, porque al verlos me veo a mi mismo hace 5 años, y me hago consciente del camino recorrido y de la ilusión que me impulsó a comenzar este trabajo.

Agradecimientos

Gracias a Saraah porque ha sido el pilar fundamental en el que me he apoyado para realizar este trabajo. Sin su cariño, amor, comprensión y ternura mi vida no sería lo mismo. Gracias por aparecer en mi vida y hacerme recobrar la ilusión en ella.

Quiero agradecer especialmente a toda mi familia el apoyo prestado, no sólo durante el desarrollo de esta tesis, sino desde que dí mi primer paso en este mundo. Gracias a mis padres, Vicente y Marisa, sin cuyo sacrificio, comprensión y confianza nunca podría haberse llevado a cabo esta tesis. Gracias a mis hermanos, Jorge y Chus, por ser quienes son y como son. Gracias a mis abuelas, Emilia y Natividad, por la ilusión y esperanzas que han depositado en mi a lo largo de todos estos años.

Y sobre todo, gracias a ti Abuelo, por que estés donde estés siempre hay algo de ti en cada cosa que hago.

ÍNDICE

Indice

	Pág
ABREVIATURAS	**29**
RESUMEN/SUMMARY	**37**
INTRODUCCIÓN	**47**
1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	**50**
1.1. Anión Superóxido	**52**
1.2. Peróxido de Hidrógeno	**56**
1.3. Alteraciones con la hipertensión en la producción de ROS	**57**
2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	**58**
2.1. Angiotensina II como mediador proinflamatorio	**61**
2.2. Angiotensina II y estrés oxidativo	**63**
2.3. Angiotensina II como regulador de la expresión y de la actividad de COX-2	**63**
3. PROSTANOIDES E HIPERTENSIÓN	**65**
3.1. Ciclooxigenasas	**67**
3.2. Regulación de la expresión de COX-2	**69**
3.3. Función vascular de los prostanoides derivados de COX-2	**71**
3.4. Alteraciones con la hipertensión en la expresión de COX-2	**72**
4. PPARs	**73**
4.1. Regulación de la expresión génica por receptores PPAR	**74**
4.1.1. Activación de la expresión génica	**74**
4.1.2. Represión de la expresión génica	**75**
4.1.2.1. Mecanismos de transrepresión	**75**
4.1.2.1.1. Secuestro de coactivadores	**75**
4.1.2.1.2. Represión génica por estabilización de complejos correpresores	**75**

4.1.2.1.3. Inhibición de rutas de señalización implicadas en la expresión de de genes proinflamatorios 76

4.1.2.1.4. Bloqueo de la activación de factores de transcripción por interacción física 77

4.1.2.2. Represión génica independiente de ligando 77

4.2. PPARγ 77

4.2.1. Efectos antiinflamatorios 79

4.2.1.1. Relación entre la activación de PPARγ y la expresión de COX-2 82

4.2.1.2. Relevancia de PPARγ en el desarrollo de patologías cardiovasculares 83

4.2.2. Efectos sobre proliferación, migración y diferenciación 84

4.2.3. Efectos metabólicos 85

4.3. PPARα 86

4.3.1. Efectos antiinflamatorios 86

4.3.2. Efectos metabólicos 87

4.4. PPAR β/δ 88

4.4.1- Efectos antiinflamatorios 88

4.4.2- Efectos metabólicos 89

OBJETIVOS 91

MATERIALES Y MÉTODOS 95

1. GRUPOS DE ANIMALES Y TRATAMIENTOS 97

2. OBTENCIÓN DE AORTA TORÁCICA PARA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL 98

3. CULTIVOS CELULARES 98

3.1. Obtención de cultivos primarios de CMLV 98

3.2. Crecimiento de cultivos primarios de CMLV 99

3.3. Crecimiento de cultivos de la línea celular HMEC-1 100

3.4. Tratamientos de cultivos primarios de CMLV 100

3.5. Tratamientos de cultivos de HMEC-1 101

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE COX-2 101

5. TRANSFECCIÓN CON ARN DE INTERFERENCIA ESPECÍFICO PARA PPARγ DE CULTIVOS DE CMLV DE SHR 102

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARNm 103

6.1. Extracción de ARN total 103

6.1.1. Extracción del ARN total de segmentos aórticos de rata 103

6.1.2. Extracción del ARN total de cultivos de CMLV 104

6.2. Cuantificación del ARN total 104

6.3. Visualización del ARN total por electroforesis en geles de agarosa 104

6.4. Retrotranscripción del ARN obtenido 105

6.5. PCR a tiempo real 106

7. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN CMLV POR EL MÉTODO DEL DIHIDROETIDIO 110

8. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H_2O_2 POR EL MÉTODO DE LA DICLOROFLUORESCEINA 111

9. EXPRESIÓN DE DATOS Y ESTADÍSTICA 112

10. FÁRMACOS Y SOLUCIONES 112

RESULTADOS 115

REGULACIÓN POR ANGIOTENSINA II DE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE COX-2 Y PPAR 117

1. EXPRESIÓN DE COX-2 117

1.1. Expresión de COX-2 en segmentos aórticos de ratas normotenasas e hipertensas 117

1.2. Efecto del tratamiento con losartán sobre la transcripción de COX-2 118

1.3. Efecto de angiotensina II sobre la expresión de COX-2 en CMLV de SHR. 120

1.3.1. Papel de las especies reactivas de oxígeno en la expresión de COX-2 inducida por angiotensina II 121

2. EXPRESION DE PPARα EN SEGMENTOS AÓRTICOS DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS 122

3. EXPRESION DE PPARγ EN SEGMENTOS AÓRTICOS DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS 124

3.1. Efecto del tratamiento con losartán sobre la expresión de PPARγ 125

REGULACIÓN POR PPAR DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1β 127

4. EXPRESIÓN DE COX-2 EN CULTIVOS DE CMLV 127

4.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV de ratas SHR y WK2 128

4.2. Papel de las especies reactivas de oxígeno en la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV 129

4.2.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de NOX-1 129

4.2.2. Efecto de IL-1β sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ 131

4.2.3. Efecto del tratamiento con apocinina sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β 131

4.2.4. Efecto de IL-1β sobre la producción de H_2O_2 132

4.2.5. Efecto del tratamiento con catalasa sobre la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β 133

4.2.6. Efecto del H_2O_2 sobre la expresión de COX-2 133

4.3. Efecto de la activación de PPARγ sobre la transcripción de COX-2 134

4.3.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β 134

4.3.2. Efecto de la transfección con siRNA de PPARγ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β 135

4.4. Efecto de la activación de los receptores PPARα sobre la transcripción de COX-2 135

4.5. Efecto de la activación de los receptores PPARα sobre la transcripción de endotelina-1 en cultivos de HMEC-1 137

5. EXPRESIÓN DE PPARγ EN CULTIVOS DE CMLV 138

5.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de PPARγ 138

5.2. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de PPARγ inducida por IL-1β 139

5.3. Efecto de PPARγ sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por IL-1β 140

5.3.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1β 140

5.3.2. Efecto de la transfección con siRNA de PPARγ sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1β 140

5.3.3. Efecto de la pioglitazona sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por IL-β 141

5.4. Efecto de la activación de PPARγ sobre la expresión de las SODs 142

5.4.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de SOD-1 y SOD-2 en CMLV de ratas normotensas e hipertensas. Papel del anión superóxido 142

5.4.2. Efecto de la pioglitazona sobre la expresión de SOD-1 y SOD-2 inducida por IL-1β en CMLV de ratas normotensas e hipertensas 145

5.5. Efecto de la pioglitazona sobre la producción de H_2O_2 inducida por IL-1β 147

5.6. Efecto de la a ctivación de PPARγ sobre la expresión de catalasa 148

5.6.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de catalasa en CMLV de ratas normotensas e hipertensas 148

5.6.2. Efecto de pioglitazona sobre la expresión de catalasa en presencia de IL-1β 151

5.6.3. Efecto de la transfección con siRNA para PPARγ sobre la expresión de catalasa inducida por IL-1β en CMLV de SHR 152

5.7. Efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la expresión de PPARγ 152

5.7.1. Efecto del tratamiento con apocinina y catalasa sobre la expresión de PPARγ en CMLV de SHR en presencia de IL-1β 152

5.7.2. Efecto de la adición exógena de H_2O_2 sobre la expresión de PPAR en CMLV de SHR 153

DISCUSIÓN 155

1. EXPRESIÓN DE COX-2 EN SEGMENTOS AÓRTICOS 157

1.1. Papel del sistema renina-angiotensina en la expresión de COX-2 en segmentos aórticos procedentes de ratas SHR y WKY 158

1.2. Papel del sistema renina-angiotensina en la expresión PPAR en segmentos aórticos procedentes de SHR y WKY 160

2. EXPRESIÓN DE COX-2 EN CULTIVOS DE CMLV 163

2.1. IL-1β induce la expresión de COX-2 en cultivos de CMLV de SHR a través del incremento en el estrés oxidativo 164

3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR PPAR EN CMLV 166

3.1. Modulación de la expresión de COX-2 por PPARγ 166

3.2. Modulación de la expresión de COX-2 por PPARα **167**

3.3. Efecto de los niveles de expresión de PPARγ sobre la transcripción de COX-2 **169**

3.4. La activación de PPARγ inhibe la expresión de COX-2 inducida por IL-1β a través de la reducción en el estrés oxidativo **171**

4.- MODULACIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES POR PPARγ **172**

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS **179**

BIBLIOGRAFÍA **189**

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Índice de gráficos

	Pág
Figura 1	52
Figura 2	53
Figura 3	54
Figura 4	55
Figura 5	59
Figura 6	61
Figura 7	62
Figura 8	66
Figura 9	66
Figura 10	68
Figura 11	70
Figura 12	73
Figura 13	74
Figura 14	75
Figura 15	76
Figura 16	76
Figura 17	77
Figura 18	77
Figura 19	78
Figura 20	99
Figura 21	105
Figura 22	107
Figura 23	109
Figura 24	109
Figura 25	110
Figura 26	117
Figura 27	117
Figura 28	118
Figura 29	118
Figura 30	119
Figura 31	119

Índice de gráficos

Figura 32 120

Figura 33 120

Figura 34 121

Figura 35 121

Figura 36 122

Figura 37 122

Figura 38 123

Figura 39 123

Figura 40 124

Figura 41 124

Figura 42 125

Figura 43 125

Figura 44 126

Figura 45 126

Figura 46 127

Figura 47 127

Figura 48 128

Figura 49 128

Figura 50 129

Figura 51 129

Figura 52 130

Figura 53 130

Figura 54 131

Figura 55 132

Figura 56 132

Figura 57 133

Figura 58 133

Figura 59 134

Figura 60 134

Figura 61 135

Figura 62 136

Figura 63 136

Índice de gráficos

Figura 64 137

Figura 65 137

Figura 66 138

Figura 67 138

Figura 68 139

Figura 69 139

Figura 70 140

Figura 71 140

Figura 72 141

Figura 73 142

Figura 74 143

Figura 75 143

Figura 76 144

Figura 77 144

Figura 78 145

Figura 79 145

Figura 80 146

Figura 81 146

Figura 82 147

Figura 83 147

Figura 84 148

Figura 85 148

Figura 86 149

Figura 87 149

Figura 88 150

Figura 89 150

Figura 90 151

Figura 91 151

Figura 92 152

Figura 93 153

Figura 94 153

Figura 95 182

Índice de gráficos

Figura 96 186

ABREVIATURAS

15d-PGJ_2: 15-Deoxi-Delta-12,14-prostaglandina J_2

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

AP-1: proteína activadora 1

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADRP: proteína relacionada con la diferenciación del adipocito

APC: célula progenitora de la médula ósea marrón

ARE: elemento rico en AUs

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido rinonucleico ribosomal

AT: receptor de angiotensina

ATF: factor activador de la transcripción

BSA: albúmina de suero bovino

C/EBP: proteína de unión a la secuencia *enhancer* CCAAT

CCR2: receptor de quimiocinas 2

CMLV: célula del músculo liso vascular

COX-1: ciclooxigenasa 1

COX-2: ciclooxigenasa-2

CREB: proteína de unión a CRE

CRE: elemento de respuesta a AMPC

CRP: proteína C reactiva

DAG: diacilglicerol

DEPC: dietilpirocarbamato

DFC-DA: diacetato de 2-7 diclorofluoresceína

DHA: ácido docosahexanoico

DHE: dihidroetidio

DP: receptor de PGD_2

DPI: yoduro de difenileno

DTT: ditiotreitol

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECA-2: enzima conversora de angiotensina tipo II

Ec-SOD: superóxido dismutasa extracelular

EDHF: factor hiperpolarizante dependiente de endotelio

EDTA: ácido etilendiamintetracético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGF-R: receptor del factor de crecimiento epidérmico

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

EP: receptor de PGE_2

EPA: ácido eicosapentaenoico

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

ES: error estándard

ET-1: endotelina-1

FCS: suero fetal de ternera

FP: receptor de $PGF_{2\alpha}$

GLUT-1: receptor de glucosa tipo 1

GLUT-4: receptor de glucosa tipo 4

GSK-3β: glucógeno sintasa quinasa 3β

GPCR: receptor acoplado a proteínas G

H_2O_2: peróxido de hidrógeno

HDAC-3: histona deacetilasa 3

HDL: lipoproteína de alta densidad

HIF-1: factor inducido por hipoxia 1

HMEC-1: línea celular endotelial microvascular humana 1

ICAM-1: molécula de adhesión celular inducible 1

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina 1

IκB: inhibidor de NFκB

IκK: quinasa del inhibidor de NFκB

IL: interleuquina

iNOS: óxido nítrico sintasa

INFγ: interferón γ

IP: receptor de PGI_2

IP_3: inositol 1,4,5-trifosfato

IP-10: proteína inducible por interferón 1

IUPHAR: International Union of Basic and Clinical Pharmacology

JAK: janus quinasa

JNK: quinasa del extremo N terminal de c-Jun

KHS: solución de Krebs-Henseleit

LDL: lipoproteína de baja densidad

LOX: lipoxigenasa

LPL: lipoproteín lipasa

LPS: lipopolisacárido bacteriano

MAPK: proteín quinasa activada por mitógenos

MCP-1: proteína quimioatractiva de monocitos 1

MMP: metaloproteinasa de matriz extracelular

MOPS: ácido morfolinopropanelsulfónico

MPM: proteína de mantenimiento de minicromosomas

MSK-1: proteín quinasa activada por estrés y mitógenos

MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NaC: N-acetil cisteína

NCOR: correpresor nuclear

NAD(P)Hox: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados

NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B

NO: óxido nítrico

$O_2^{\cdot-}$: anión superóxido

$OH^{\cdot}$: radical hidroxilo

$ONOO^-$: peroxinitríto

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDGF-R: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDTC: pirrolidinditiocarbamato

PG: prostaglandina

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa

PIAS: proteína inhibidora de STAT activado 1

PKA: proteín quinasa A

PKC: proteín quinasa C

PLA_2: fosfolipasa A_2

PLC: fosfolipasa C

PMA: 12-miristato 13-acetato forbol

PPAR: receptor activador de la proliferación peroxisomal

PPRE: elemento de respuesta a AMPc

PTK: proteín tirosín quinasa

PTP: proteín tirosín fosfatasa

RAS: sistema renina angiotensina

ROS: especies reactivas de oxígeno

RXR: receptor X del ácido cis retinoico

SDS: dodecil sulfato sódico

siRNA: ácido ribonucleico de interferencia

SOD-1: superóxido dismutasa 1

SOD-2: superóxido dismutasa 2

SHR: rata espontáneamente hipertensa

SHR-SP: rata espontáneamente hipertensa "*stroke prone*"

SMRT: mediador de silenciamiento de los receptores del ácido retinoico y de la hormona tiroidea

SRA: receptor secuestrador de clase A

STAT: proteína transductora de señal y activadora de transcripción

SUMO: modificador similar a la ubiquitina

Tab2: proteína de unión a Tak 2

TEMED: N,N,´N,´N-tetrametil-etilenodiamida

TGFβ: factor de crecimiento transformante β

TIL-1: locus de integración de células T

TLR: "*toll*" like receptor

TNFα: factor de necrosis tumoral α

TP: receptor del tromboxano A_2

Tpl2: locus de progresión tumoral 2

TRAF-6: factor asociado al receptor de TNF

TXA_2: tromboxano A_2

TZD: tiazolidinediona

Ubc9: enzima conjugadora de ubiquitina 9

UV: luz ultravioleta

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

WKY: rata Wistar-Kyoto

RESUMEN/SUMMARY

La hipertensión es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por niveles elevados de citoquinas proinflamatorias circulantes (Pauletto y Rattazzi, 2006; Savoia y Schiffrin, 2006; Marchesi y col., 2008) y de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001a; Zhou y col., 2003; Lee y Griendling, 2008), ambos eventos íntimamente relacionados con las alteraciones estructurales y funcionales observadas en esta patología. El estrés oxidativo activa factores de transcripción redox sensibles (Barchowsky y col., 1995; Bowie y O´Neill, 2000) implicados en la expresión de citoquinas y de enzimas proinflamatorias (Roshak y col., 1996; Chun y Suhr, 2004; Tsatsanis y col., 2006), sugiriendo que la inflamación vascular observada en la hipertensión podría ser dependiente del incremento en los niveles de ROS. Entre las diferentes enzimas cuya actividad y expresión se encuentra incrementada en esta patología vascular está la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2), principal objetivo de este estudio. Puesto que COX-2 se induce por diversos mediadores proinflamatorios (Sakai y col., 2001; El Haroun y col., 2004; Briones y col., 2005; Vila-del Sol y Fresno, 2005), además de por la producción de ROS (Peng y col., 2005) se puede establecer un nexo entre su expresión, el incremento en el estrés oxidativo y el estado inflamatorio vascular. Los prostanoides sintetizados por COX-2 pueden ejercer acciones proinflamatorias, indicando que alteraciones en la actividad de esta enzima y/o en su expresión podrían estar implicadas en las alteraciones funcionales y en la respuesta inflamatoria vascular observada en la hipertensión (García-Cohen y col., 2000; Adeagbo y col., 2005; Álvarez y col., 2005; 2007; Jaimes y col., 2008).

La hipertensión se asocia con un incremento en la activación del sistema renina-angiotensina (RAS). La angiotensina II, principal péptido efector de este sistema, podría estar implicada en las alteraciones funcionales y estructurales relacionadas con la inflamación vascular asociada a la hipertensión debido a su capacidad para aumentar la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Sanz-Rosa y col., 2005a; 2005b), incrementar el estrés oxidativo (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000; Pueyo y col., 2000; Seshiah y col., 2002; Zhou y col., 2003) e inducir la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Ohnaka y col., 2000; Hu y col., 2002; Beltrán y col., 2009). Puesto que la angiotensina II lleva a cabo sus acciones proinflamatorias a través del incremento del estrés oxidativo y de la expresión de COX-2, las alteraciones en la expresión de esta enzima proinflamatoria descritas con la hipertensión podrían estar relacionadas con el incremento en la actividad del RAS.

Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs) son receptores nucleares expresados a nivel vascular (Schiffrin y col., 2003; Hsueh y Bruemmer, 2004; Wu y col., 2004). En los últimos tiempos la importancia de los PPARs está creciendo debido a sus acciones antiinflamatorias y vasculares (Staels y col., 1998a; Jiang y col., 1998; Ricote y col., 1999; Ricote y Glass, 2007), sugiriendo que estos receptores nucleares podrían desempeñar un papel importante en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hipertensión. Las acciones antiinflamatorias ejercidas por los PPARs pueden llevarse a cabo a través de la reducción del estrés oxidativo (Sung y col., 2006) y/o de la inhibición de la expresión de citoquinas o de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Mendez y Lapointe, 2003; Cuzzocrea y col., 2004). Así, los PPARs podrían ser reguladores clave de la expresión de COX-2 inducida por el incremento de la actividad del RAS o por la exposición crónica a citoquinas proinflamatorias observada en la hipertensión.

Los objetivos de este estudio han sido: 1) Analizar si la hipertensión produce alteraciones en la expresión vascular de COX-2 asociadas al incremento en la actividad del sistema renina angiotensina y si estas alteraciones se relacionan con los niveles de expresión de los receptores PPAR. 2) Determinar el papel

de las especies reactivas de oxígeno sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β. 3) Analizar si los niveles de expresión de PPARγ y/o su activación contribuyen a la regulación de la expresión de COX-2 y de otras enzimas implicadas en el estado inflamatorio vascular inducido por la IL-1β y, si este efecto podría llevarse a cabo a través de mecanismos relacionados con la reducción del estrés oxidativo.

En este estudio hemos utilizado segmentos de aorta torácica de ratas normotensas (WKY) e hipertensas (SHR) sin tratar y tratadas con el antagonista de los receptores AT-1 losartán (15 mg/Kg /día), en los cuales hemos llevado a cabo el análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de los principales genes diana de este estudio utilizando RT-PCR. Además, se han utilizado cultivos primarios de células de músculo liso vascular (CMLV) de aorta procedentes de ratas SHR y WKY para analizar *"in vitro"* los efectos de angiotensina II e IL-1β sobre la expresión de COX-2, así como el papel de los PPARs en la regulación de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β. En estos cultivos hemos analizado los niveles de ARNm de COX-2 y otros genes implicados en el estrés oxidativo y la inflamación vascular por RT-PCR "a tiempo real", el efecto de los niveles de expresión de PPARγ utilizando un ARN de interferencia específico y el efecto de la angiotensina II sobre la expresión proteica de COX-2 por western blot. Asímismo, se ha determinado la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 tras el tratamiento con IL-1β y el efecto de la activación de PPARγ sobre la misma.

Los principales hallazgos de este estudio son: 1) En la hipertensión existe un incremento en la expresión de la enzima proinflamatoria COX-2 asociado a la mayor actividad del sistema renina-angiotensina. La angiotensina II circulante contribuye al incremento de la expresión vascular de COX-2 observada en la hipertensión, a través de la activación de los receptores AT-1. 2) El incremento en la expresión de COX-2 inducido por angiotensina II se asocia con el incremento en el estrés oxidativo, como consecuencia de la inducción de la expresión de la subunidad catalítica la NAD(P)Hox NOX-1 y, probablemente, del aumento en la actividad de este complejo enzimático. 3) En la hipertensión no se modifica la expresión de PPARα, mientras que la de PPARγ está reducida, probablemente, como consecuencia del incremento en la activación del RAS observado en esta patología vascular. Los menores niveles de expresión de PPARγ podrían estar implicados en el incremento de la expresión de COX-2 previamente descrito. 4) De acuerdo con el estado inflamatorio vascular asociado a la hipertensión, el incremento en la transcripción de COX-2 inducido por mediadores proinflamatorios como la IL-1β es mayor en CMLV de animales hipertensos. 5) La inflamación vascular contribuye al incremento en el estrés oxidativo descrito en la hipertensión. Así, la exposición de CMLV procedentes de animales hipertensos a IL-1β incrementa los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2, como consecuencia del incremento en la expresión de NOX-1 y/o en la actividad de la NAD(P)Hox. Estas especies reactivas de oxígeno contribuyen a la inducción de COX-2 en CMLV de animales hipertensos estimulados con esta citoquina. 6) El estrés oxidativo inducido por IL-1β en CMLV de animales hipertensos también activa mecanismos antioxidantes como la expresión de las enzimas detoxificantes SODs o la catalasa. 7) La activación de PPARγ, pero no de PPARα, induce su propia expresión y reduce la expresión de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV de ratas SHR por inhibición de la transcripción de NOX-1inducida por la citoquina y, por consiguiente, por reducción de los niveles de ROS derivados de la NAD(P)Hox. 8) La IL-1β también induce la expresión de PPARγ en CMLV de animales hipertensos por un mecanismo dependiente de la producción de H_2O_2. El aumento en la expresión de PPARγ constituye un mecanismo antioxidante y antiinflamatorio endógeno implicado en la inducción de enzimas detoxificantes como la

catalasa y en la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes como NOX-1 y, por tanto, explicaría la inhibición de la expresión de COX-2 inducida por citoquinas proinflamatorias tras la activación de dicho receptor.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que PPARγ desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria vascular. Los efectos observados con el activador de PPARγ pioglitazona en CMLV de 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. Como hemos demostrado, el incremento en la activación del RAS observado en ratas SHR está implicado en la reducción de los niveles de PPARγ observada en esta cepa. Los menores niveles de expresión de este receptor nuclear suponen una reducción en un mecanismo endógeno protector frente al incremento en el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria vascular inducida por los elevados niveles de citoquinas proinflamatorias descritos en la hipertensión. Además, el aumento en la expresión de COX-2 asociado a los menores niveles de PPARγ en ratas SHR mostrado en este estudio podría ayudar a explicar algunas de las alteraciones funcionales y estructurales descritas en la patología hipertensiva.

Hypertension is a chronic inflammatory disease characterized by high levels of circulating proinflammatory cytokines (Pauletto and Rattazzi, 2006; Savoia and Schiffrin, 2006; Marchesi et al., 2008) and reactive oxygen species (ROS) (Zalba et al., 2000; Beswick et al., 2001a; Zhou et al., 2003; Lee and Griendling, 2008), two events closely related to structural and functional alterations observed in this pathology. The oxidative stress activates redox sensitive proinflammatory transcription factors (Barchowsky et al., 1995; Bowie and O´Neill, 2000) involved in the expression of cytokines and proinflammatory enzymes (Roshak et al., 1996; Chun and Suhr, 2004; Tsatsanis et al., 2006), suggesting that vascular inflammation observed in hypertension could be dependent of the increase in ROS levels. Among the different enzymes which activity and expression are increased in hypertension is the inducible isoform of cyclooxygenase (COX-2). Since COX-2 is induced by different proinflammatory mediators (Sakai et al., 2001; El Haroun et al., 2004; Briones et al., 2005; Vila-del Sol and Fresno, 2005) as well as by ROS production, a relationship between its expression and the vascular inflammatory state could be established. In this sense, COX-2 derived products, besides modulate the vascular tone, are also able to exert proinflammatory vascular actions indicating that alterations in the activity and/or expression of this enzyme could be involved in the functional alterations and in the inflammatory response observed in hypertension (García-Cohen et al., 2000; Adeagbo et al., 2005; Álvarez at al., 2005; Jaimes et al., 2008).

Hypertension has been associated to increase renin-angiotensin system (RAS) activation (Ruiz-Ortega et al., 2006; Boos and Lip, 2006; Kobori et al., 2007). Angiotensin II,the main effector peptide of this system, could be involved in the functional and structural alterations related to the vascular inflammation associated to hypertension due to its ability to increase the synthesis of proinflammatory cytokines (Sanz-Rosa et al., 2005a; 2005b), the oxidative stress (Rajagopalan et al., 1996; Zalba et al., 2000; Pueyo et al., 2000; Seshiah et al., 2002; Zhou et al., 2003) and to induce the expression of proinflammatory enzymes such as COX-2 (Ohnaka et al., 2000; Hu et al., 2002; Beltrán et al., 2009). Since angiotensin II induces its proinflammatory actions through by increasing the oxidative stress and COX-2 expression, alterations in the expression of this proinflammatory enzyme described in hypertesnsion could be related to the increase in RAS activity.

The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) are nuclear receptors expressed at vascular level (Schiffrin et al., 2003; Hsueh and Bruemmer, 2004; Wu y et al., 2004). Recently, the importance of PPARs is rising due its antiinflamatory and vascular actions (Staels et al., 1998a; Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1999; Ricote and Glass, 2007), suggesting that these nuclear receptors could play an important role in the development of new therapeutic strategies in hypertension treatment. The anti-inflammatory actions induced by PPARs could be exerted through to the oxidative stress reduction (Sung et al., 2006) and/or by inhibiting the expression of cytokines and proinflammatory enzymes such as COX-2 (Mendez and Lapointe, 2003; Cuzzocrea et al., 2004). Therefore, PPARs due to theirs antioxidant and anti-inflammatory actions could be key regulators in the COX-2 expression induced by the increased RAS activity or by the chronic exposure to proinflammatory cytokines observed in hypertension.

The goals of the present study have been: 1) To analyze if hypertension produces alterations in the COX-2 vascular expression associated to the increase in RAS activity and whether this alterations could be related to PPARs expression levels. 2) To determine the role of ROS on COX-2 expression induced byIL-1β. 3) To analyze if PPARγ expression levels and/or its activation contributes to the regulation of the

expression of COX-2 and another enzymes involved in the vascular inflammatory state induced by IL-1β and whether this effect could be exerted through mechanisms related to the reduction in the oxidative stress.

We have used thoracic aortic segments from normotensive (WKY) and hypertensive (SHR), untreated and treated with the AT-1 receptor antagonist losartan (15 mg/Kg/day). In these samples we have analyzed the mRNA levels of the main targets genes of this study using RT-PCR. In addition, we have used primary cultures of aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) from SHR and WKY rats to analyze *"in vitro"* the angiotensin II and IL-1β effect on COX-2 expression, as well as to determine the role of PPARs in the regulation of COX-2 expression induced by IL-1β. In these cultures we have analyzed the mRNA COX-2 levels and other genes involved in the oxidative stress and vascular inflammation by using RT-PCR, the effect of PPARγ expression levels by siRNA transfection, and the effect of angiotensin II on COX-2 protein expression by western blot. Moreover, it has been determined the $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production after IL-1β treatment and the PPARγ effect on this process.

The main findings of this study are: 1) In hypertension there is an increase in the proinflammatory enzyme COX-2 expression associated to the higher renin-angiotensin system activity. The circulating angiotensin II contributes to the increased COX-2 vascular expression through the AT-1 receptors activation. 2) The increase in COX-2 expression induced by angiotensin II is associated to the increase in the oxidative stress, as a consequence of the induction of the NAD(P)Hox catalytic subunit NOX-1 expression and, probably, due to the increase in the activity of this enzymatic complex. 3) In hypertension PPARγ, but not PPARα, expression is reduced. The increase in RAS activity contributes to the reduction of PPARγ expression observed in this vascular pathology. The lower PPARγ expression levels could be involved in the increase in COX-2 expression previously described. 4) According to the vascular inflammatory state associated to hypertension, the increase in COX-2 transcription induced by proinflammatory mediators such as IL-1β is higher in VSMC from hypertensive animals. 5) The vascular inflammation contributes to the increase in the oxidative stress described in hypertension. Thus, the exposure of VSMC from hypertensive animals to IL-1β increases $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 levels as a consequence of the increase in NOX-1 expression and/or in the NAD(P)Hox activity, which contribute to COX-2 induction in VSMC from hypertensive animals stimulated with this cytokine. 6) The oxidative stress induced by IL-1β in VSMC from hypertensive animals also activates antioxidant mechanisms such as the expression of detoxificant enzymes including SODs or catalase. 7) PPARγ activation, but not PPARα, induces its own expression and reduces COX-2 expression induced by IL-1β in VSMC from SHR rats by mechanisms involved in the inhibition of NOX-1 transcription induced by the cytokine and, furthermore, by the reduction in the ROS levels derived from NAD(P)Hox. 8) IL-1β induces PPARγ expression in VSMC from hypertensive animals by a H_2O_2 dependent pathway. The increase in the expression of PPARγ constitutes an endogenous antioxidant and anti-inflammatory mechanism involved in the induction of detoxificant enzymes such as catalase as well as in the inhibition of the expression of prooxidant enzymes like NOX-1. This would explain the inhibition of COX-2 expression after PPARγ activation.

In conclusion, the results obtained in this study suggest that PPARγ plays an important role in the regulation of vascular inflammatory response. The effects observed with the PPARγ activator pioglitazone in VSMC from SHR confirm that this receptor is key in the reduction of ROS production induced by cytokines and also in the expression of proinflammatory enzymes such as COX-2. On the other hand, the

increase in RAS activation observed in SHR seems to be involved in the reduction of PPARγ levels observed in this strain. The lower expression levels of this nuclear receptor brings about a reduction in a protective endogenous mechanism against to the increase in the oxidative stress and the vascular inflammatory response induced by the high levels of proinflammatory cytokines described in hypertension. In addition, the increase in COX-2 expression associated to the lower levels of PPARγ expression, showed in this study, could help to explain some of the functional and structural alterations observed in the hypertensive pathology.

INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es una patología de gran incidencia en países desarrollados. Los daños cardiovasculares y renales asociados a su desarrollo constituyen a día de hoy la primera causa de mortalidad en países industrializados. Este argumento basta por si solo para justificar la necesidad de una mayor comprensión de los factores fisiopatológicos implicados en la hipertensión y exigir una mayor motivación científica a nivel mundial orientada al diseño de nuevas estrategias y terapias más eficaces para abordar esta patología.

La hipertensión arterial se caracteriza por un incremento en la resistencia vascular periférica y se asocia a alteraciones vasculares estructurales, mecánicas y funcionales, todo lo cual contribuye a incrementar el riesgo de accidente cardiovascular (Tuñón y col., 2000; Mulvany, 2003; Paravicini y Touyz, 2006; 2008; Marchesi y col., 2008). Una alteración clave vinculada a esta patología es el remodelado vascular. Así, vasos de modelos animales o de sujetos hipertensos presentan una reducción en el diámetro interno tanto en arterias de resistencia como en arterias de conductancia. Este remodelado vascular se debe a la hipertrofia de las células musculares lisas vasculares (CMLV) así como a un aumento en la deposición de proteínas de matriz extracelular (Intengan y Schiffrin, 2001). Además, la disfunción endotelial asociada a un incremento en las respuestas vasoconstrictoras a distintos agonistas y/o al deterioro de las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio está también presente en la patología hipertensiva.

En los últimos años se ha descrito la existencia de un estado inflamatorio crónico asociado a la hipertensión que puede estar involucrado en las alteraciones estructurales y funcionales que aparecen en la misma (Suzuki y col., 2003; Pauletto y Rattazzi, 2006; Savoia y Schiffrin, 2006; Marchesi y col., 2008). En modelos animales de hipertensión se ha descrito la existencia de niveles elevados de citoquinas circulantes (Sanz-Rosa y col., 2005a; 2005b) y mediadores proinflamatorios como angiotensina II (Ruiz-Ortega y col., 2006), así como una elevada expresión y actividad de enzimas proinflamatorias como las isoformas inducibles de la ciclooxigenasa (COX-2) (García-Cohen y col., 2000; Adeagbo y col., 2005; Álvarez y col., 2005; 2007; Jaimes y col., 2008) o de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Briones y col., 2000; 2002; Álvarez y col., 2008a). A nivel clínico, los pacientes con hipertensión esencial presentan elevados niveles plasmáticos de selectina-E y de las moléculas de adhesión ICAM-1 (molécula de adhesión celular inducible 1) y VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular 1), marcadores de inflamación y responsables del incremento en el reclutamiento de monocitos y macrófagos en la pared vascular (Suzuki y col., 2003; Pauletto y Rattazzi, 2006). Asociado a este estado proinflamatorio, se encuentra un incremento en el estrés oxidativo plasmático y vascular (Paravicini y Touyz, 2006; 2008). El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno es responsable de la activación de factores de transcripción como AP-1 (proteína activadora 1) o NFκB (factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B) (Barchowsky y col., 1995; Bowie y O´Neill, 2000; Beswick y col., 2001b), ambos implicados en la inducción de la expresión de citoquinas como interleuquina 6 (IL-6) o interleuquina 1β (IL-1β), y de enzimas como COX-2, cuyos derivados, además de presentar actividad vascular, son importantes mediadores de la respuesta inflamatoria (Roshak y col., 1996; Chun y Suhr, 2004; Tsatsanis y col., 2006).

La angiotensina II, el péptido vasoactivo por excelencia del sistema renina-angiotensina, podría estar implicado en las alteraciones funcionales, estructurales y en la inflamación vascular asociada a la patología hipertensiva debido a su capacidad para inducir estrés oxidativo y activar la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Ohnaka y col., 2000; Hu y col., 2002; Ruiz- Ortega y col., 2006; Álvarez y

col., 2007; Beltrán y col., 2009). Además, íntimamente relacionado con su contribución a la inflamación vascular, la angiotensina II estimula la producción de citoquinas proinflamatorias. Así, Sanz-Rosa y col. (2005a; 2005b) demostraron en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) que asociado al incremento en la activación del sistema renina-angiotensina se observaba un aumento tanto en arterias como en plasma de los niveles de IL-1β, IL-6 y factor de necrosis tumoral α (TNFα). Este aumento en citoquinas circulantes y vasculares con la hipertensión arterial podría contribuir al incremento en la expresión de COX-2 observado en vasos de SHR (Álvarez y col., 2005) y aportaría nuevos datos que ayudarían a comprender mejor el mecanismo de activación transcripcional de COX-2 inducido por angiotensina II.

Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs) son receptores nucleares que se expresan en los distintos tipos celulares presentes en la pared vascular y cuya actividad cardioprotectora y antiinflamatoria está ganando cada vez más relevancia. Los PPARs pueden jugar un papel importante en la hipertensión (Schiffrin y col., 2003; Hsueh y Bruemmer, 2004; Wu y col., 2004) debido a su capacidad para reducir el estrés oxidativo (Sung y col., 2006) y antagonizar las rutas de activación de factores de transcripción proinflamatorios implicados en la expresión y liberación de citoquinas (Jiang y col., 1998; Ricote y col., 1999) o la expresión de COX-2 (Subbaramaiah y col., 2001; Mendez y Lapointe, 2003; Cuzzocrea y col., 2004).

Por ello, en esta Introducción se hará una revisión de los conocimientos que hoy se tienen en relación con la patología hipertensiva acerca de:

1. Especies reactivas de oxígeno
2. Sistema renina-angiotensina
3. Prostanoides
4. Receptores PPAR

1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas derivadas de oxígeno que se producen como resultado del metabolismo oxidativo aerobio en prácticamente todas las células, incluyendo las componentes de la pared vascular. 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 col., 1998; Griendling y col., 2000). Así, las ROS, a concentraciones intracelulares moderadas, son clave en las rutas fisiológicas de señalización celular; sin embargo, a concentraciones elevadas, pueden provocar toxicidad. De hecho, a partir de la pasada década, el papel de las ROS ha ido cobrando cada vez mas relevancia debido a su participación en la mayoría de las rutas de señalización intracelular implicadas en el remodelado vascular, los cambios en la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores, la hipertrofia de células de la pared del vaso y la inflamación crónica asociada a patologías como la hipertensión (Griendling y col., 2000; Paravicini y Touyz, 2006; 2008).

Citoquinas proinflamatorias o factores de crecimiento como IL-1β (Meier y col., 1989), TNFα (Basuroy y col., 2008) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Shi y col., 2004) o la angiotensina II (Rajagopalan y col., 1996; Welch, 2008) activan la producción de ROS por mecanismos celulares dependientes de PKC

(proteína quinasa C), PLD (fosfolipasa D), c-Src y receptores tirosina kinasas como EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico) o PDGF-R (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), todos los cuales desembocan en la activación de distintas quinasas como Akt (Ushio-Fukai y col., 1999), ERKs (proteín quinasas reguladas por señales extracelulares) (Zhang y col., 1998), p38MAPK (Ushio-Fukai y col., 1998) o JNK (proteín quinasa del extremo N terminal de c-jun) (Yoshizumi y col., 2000). En última instancia, el icremento en la producción de ROS da lugar a la activación de factores de transcripción proinflamatorios como NFκB (Bowie y O´Neill, 2000; Beswick y col., 2001b; Lin y col., 2005), STATs (proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (Simon y col., 1998), HIF-1 (factor inducido por hipoxia 1) (Sánchez López y col., 2005) o AP-1 (Lin y col., 2005), regulando de ese modo la migración y la proliferación celular, además de la expresión de genes proinflamatorios como ICAM-1 (Lin y col., 2005), VCAM-1 (Marui y col., 1993), COX-2 (Tetsuka y col., 1996; Álvarez y col., 2007), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) (Chua y col., 1998) y MCP-1 (proteína quimioatractiva de monocitos 1) (Chen y col., 1998).

Además de su efecto proinflamatorio, las ROS también participan directamente en la regulación del tono vascular, activando la expresión de genes implicados en la funcionalidad vascular y reduciendo la biodisponibilidad de NO, lo que contribuye al incremento de la resistencia vascular periférica y al aumento de las respuestas vasoconstrictoras (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001b).

Entre las especies reactivas de oxígeno, encontramos el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) o el peroxinitrito ($ONOO^-$). Tanto el $O_2^{\cdot-}$como el $OH^{\cdot}$ tienen una vida media muy corta y no pueden atravesar membranas lipídicas a no ser que usen canales iónicos. Por su parte, el H_2O_2 producto generado a partir del $O_2^{\cdot-}$ por mecanismos celulares detoxificantes, es la especie más estable y puede difundir libremente entre los compartimentos celulares. El $ONOO^-$, un intermedio muy reactivo formado a partir de la interacción del $O_2^{\cdot-}$ con el NO, es capaz de activar una gran cantidad de rutas de señalización celular como las dependientes de JNK, MMPs (metaloproteinasas de matriz) o la expresión de moléculas de adhesión celular, además de ser responsable de diversos efectos deletéreos como la nitración de proteínas (Paravicini y Touyz, 2006; 2008).

Debido a la alta actividad celular inducida por las ROS, se requiere una fina regulación 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. 1). Estos mecanismos consisten, fundamentalmente, en la inducción de la expresión de enzimas detoxificantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa o la glutatión peroxidasa (Faraci y Didion, 2004; Johnson y col., 2005; Wassman y col., 2006).

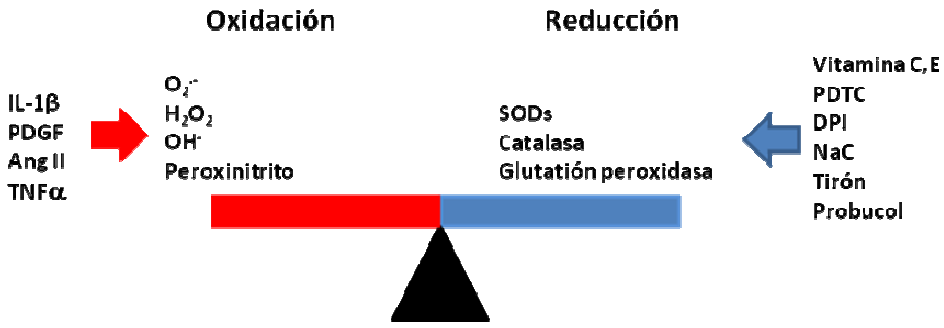


Fig. 1: El estado oxidativo de las células de la pared vascular depende del balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad de las defensas antioxidantes celulares. Estímulos como la angiotensina II o citoquinas proinflamatorias desplazan el equilibrio a un estado prooxidante, mientras que antioxidantes como las SODs, la glutatión peroxidasa o la catalasa mantienen el entorno en un estado reductor. Ang II: angiotensina II, DPI: Yoduro de difenileno, IL-1β: interleuquina-1β, NaC: N-acetil-cisteína, PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDTC: pirrolidinditiocarbamato, SODs: superóxido dismutasas, TNFα: factor de necrosis tumoral α.

1.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido, que se genera por la adición de un electrón al oxígeno molecular, tiene una vida media muy corta como consecuencia de su rápida reducción a H_2O_2 por las SODs celulares, y debido a su carga no puede atravesar libremente las membranas, aunque si puede utilizar canales iónicos de transporte. El $O_2^{\cdot-}$ juega un papel clave en la biología vascular, participando en procesos de inflamación, disfunción endotelial, proliferación celular, migración, deposición de matriz extracelular, fibrosis, angiogénesis y remodelado vascular, lo que hace que sea una diana a considerar en patologías donde sus niveles son elevados como la hipertensión, la aterosclerosis o la diabetes.

El $O_2^{\cdot-}$ puede ser generado por diversas fuentes como la cadena respiratoria mitocondrial, la xantina oxidasa, la COX, la lipoxigenasa, el citocromo P450 o la iNOS. Sin embargo, la principal fuente vascular de $O_2^{\cdot-}$ es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa o NAD(P)H oxidasa (NAD(P)Hox), un complejo enzimático expresado en todos los tipos celulares integrantes de la pared vascular (Fig. 2) (Lassegue y Clempus, 2003; Lyle y Griendling, 2006; Griendling, 2006; Bedard y Krause, 2007). Esta enzima utiliza como donador electrónico el NADH/NADPH, reduciendo el O_2 y produciendo $O_2^{\cdot-}$. La NAD(P)Hox prototípica fue descrita primeramente en macrófagos, donde ejerce funciones microbicidas, y está formada por cinco subunidades, tres subunidades citosólicas, p47phox, p67phox y p40phox y dos subunidades transmembrana, p22phox y gp91phox o NOX-2, que forman el complejo catalítico y constituyen el citocromo b558. Sin embargo, existe una familia entera de NAD(P)Hox que difieren en la subunidad gp91phox presente en fagocitos, la cual es sustituida por subunidades homólogas, de las cuales, dependiendo del tipo celular donde se exprese, se han descrito hasta la fecha seis subunidades: NOX-1, NOX-3, NOX-4, NOX-5, DUOX-1 y DUOX-2. De éstas, son las subunidades NOX-1, NOX-2 y NOX-4 las que se expresan a nivel vascular. Concretamente en CMLV sólo se expresan NOX-1 y NOX-4, siendo NOX-1 la que parece estar más implicada en el aumento del estrés oxidativo (Lassegue y col., 2001; Dikalova y col., 2005; Matsuno y col., 2005, Dikalov y col., 2008). Recientemente se han identificado subunidades homólogas también para los componentes reguladores del complejo p47phox y p67phox, denominadas NOXO1 y NOXA-q, que también podrían desempeñar una función clave en el incremento en

el estrés oxidativo (Cheng y Lambeth, 2004; Ambasta y col., 2006). La activación de la NAD(P)Hox requiere el ensamblaje de sus unidades citosólicas p47phox y p67phox a las subunidades ancladas en membrana (gp91phox o sus homólogos NOX-1, NOX-4 y p22phox) para formar un complejo enzimático funcional. La fosforilación de p47phox activa su translocación a la membrana, su ensamblaje con el resto de subunidades y la activación de Rac-1, efector último de la generación de $O_2^{\cdot-}$ (Li y Shah, 2002; Seshiah y col., 2002; Lassegue y Clempus, 2003).

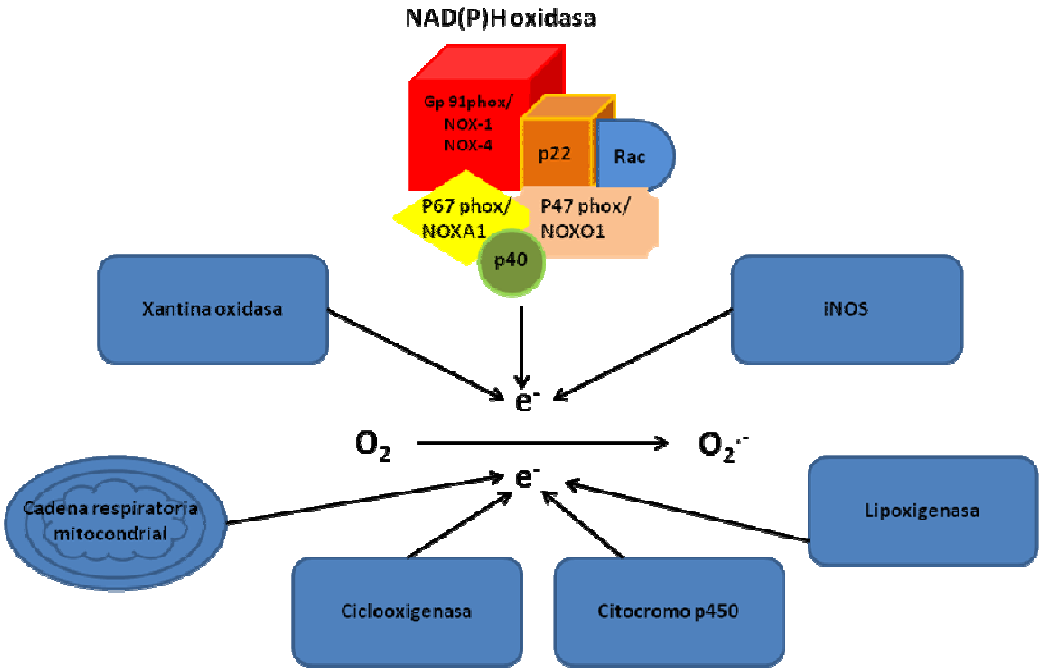


Fig. 2: Fuentes enzimáticas de $O_2^{\cdot-}$. Las principales enzimas responsables de la generación de esta ROS a nivel vascular son: la NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa, iNOS, Lipoxigenasa, citocromo P450 y COX. COX: ciclooxigenasa, iNOS: isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa, NAD(P)H oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.

La activación de la NAD(P)Hox tiene lugar por multitud de estímulos que van desde el estrés mecánico a factores de crecimiento como TGF-β (factor de crecimiento transformante β) o PDGF, citoquinas como TNFα o IL-1β o agentes vasoactivos, de los que el más estudiado es la angiotensina II (Fig. 3). La angiotensina II activa la NAD(P)Hox vía receptores AT-1 por un mecanismo dependiente de la activación de PKC, PLA_2 (fosfolipasa A_2), c-Src y diversos receptores tirosín-kinasas, incrementando además la expresión de sus subunidades (Seshiah y col., 2002; Lyle y Griendling, 2006). El hecho de que ratones que sobreexpresan las subunidades NOX-1 o gp91phox presenten mayores respuestas vasoconstrictoras a angiotensina II (Dikalova y col., 2005), mientras que en ratones deficientes en alguna subunidad de la NAD(P)Hox éstas sean menores (Matsuno y col., 2005), sugiere que el anión superóxido derivado de la NAD(P)Hox es un importante modulador del tono vascular inducido por angiotensina II.

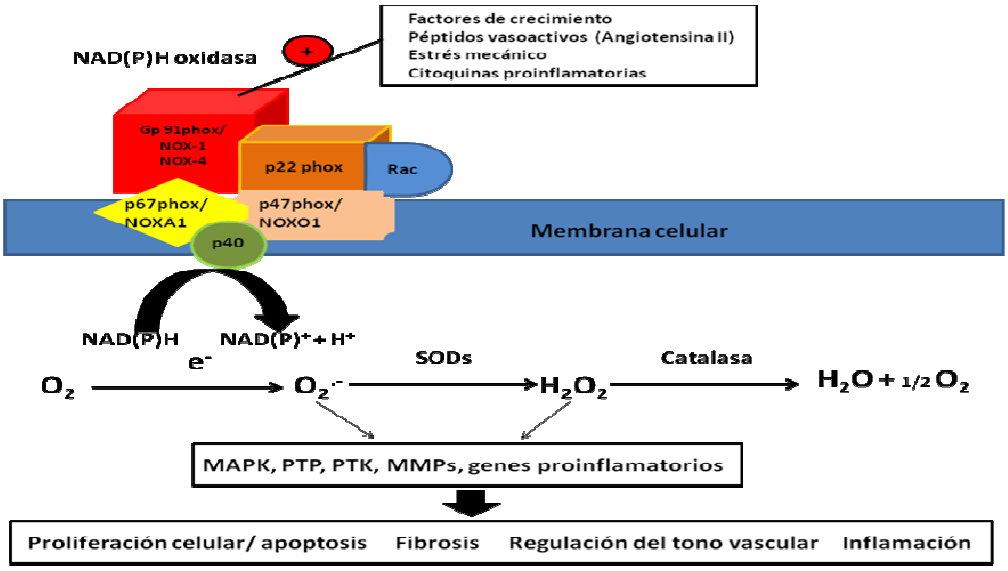


Fig. 3: La activación de la NAD(P)H oxidasa vascular induce la formación de ROS, las cuales activan rutas de señalización implicadas en crecimiento celular, fibrosis, respuestas vasoactivas o inflamación, procesos que contribuyen al remodelado vascular observado en la hipertensión. MAPK: Proteín quinasas activadas por mitógenos, MMPs: metaloproteinasas de matriz, NAD(P)H oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa, PTK: proteín-tirosín quinasas, PTP: proteín-tirosín fosfatasas, SODs: superóxido dismutasas (adaptado de Paravicini y Touyz, 2008).

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. En mamíferos existen 3 isoformas descritas de SODs, codificadas por genes distintos. Las 3 isofomas de SODs, denominadas SOD1, SOD2 y SOD3, presentan distinta localización celular, lo que sugiere que su actividad es específica del compartimento donde se lleva a cabo, y presentan en su centro catalítico metales que permiten llevar a cabo su reacción detoxificante. Así, la SOD-1 o Cu/Zn-SOD es citosólica, la SOD-2 o Mn^{2+}-SOD es mitocondrial y la SOD-3 o Ec-SOD, con un núcleo de Cu/Zn al igual que la SOD-1, está orientada hacia el espacio extracelular (Fig. 4).

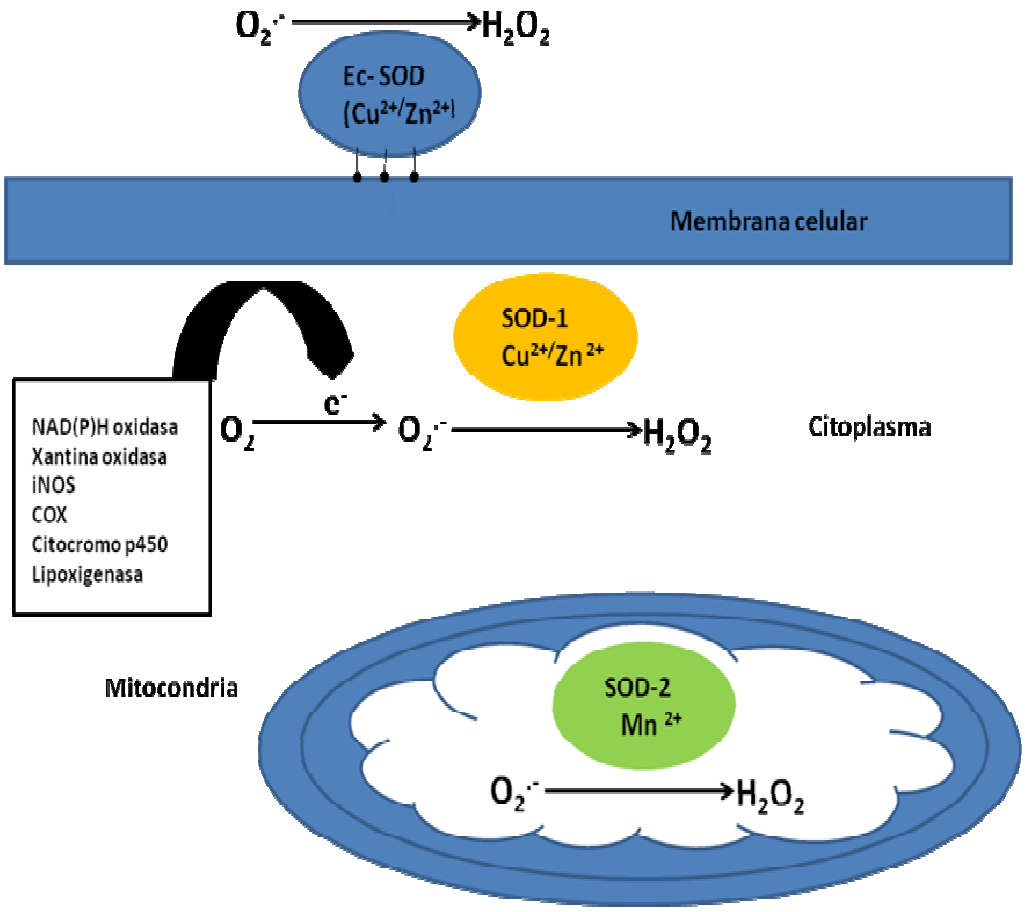


Fig. 4: Localización subcelular de las 3 isoformas de SOD: Cu/Zn-SOD localizada principalmente en el citosol, Mn^{2+}-SOD en la mitocondria y la Ec-SOD a nivel extracelular. Todas ellas generan H_2O_2 a partir de $O_2^{\cdot-}$. COX: ciclooxigenasa, Cu/Zn-SOD: Cu/Zn superóxido dismutasa, ec-SOD: superóxido dismutasa extracelular, iNOS: isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa, LOX: Lipoxigenasa, Mn^{2+}-SOD: Mn^{2+} superóxido dismutasa, NAD(P)H oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa.

Existe una íntima asociación entre los niveles de expresión de las SODs y el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$, otorgando a las SODs un papel fundamental en las respuestas vasculares al estrés oxidativo (Morikawa y col., 2003; Wassman y col., 2004; Faraci y Didion, 2004; Johnson y col., 2005). Uno de los efectos más relevantes a nivel vascular del $O_2^{\cdot-}$ son sus propiedades vasoactivas; así, es capaz de inducir vasoconstricción (Didion y Faraci, 2002), participando en la contracción ejercida por diferentes agonistas como la fenilefrina y disminuyendo relajaciones endotelio-dependientes (Álvarez y col., 2008a; Wiggers y col., 2008). El $O_2^{\cdot-}$ reduce la biodisponibilidad del NO, interaccionando con él y formando $ONOO^-$; esta especie reactiva de oxígeno es capaz de mediar vasoconstricción por un mecanismo dependiente de la inactivación por nitración de la PGI_2 sintasa y de la consecuente reducción en los niveles del prostanoide vasodilatador PGI_2 (Bachschmid y col., 2003; Schildknecht y Ullrich, 2008). Sin embargo, a pesar de la implicación del $O_2^{\cdot-}$ en la vasoconstricción, también existen estudios que demuestran la contribución de esta especie reactiva de oxígeno a la activación de mecanismos implicados en la vasodilatación (Marín y Rodríguez-Martínez, 1995).

El anión superóxido, además de sus efectos vasoactivos, puede interferir con otras moléculas fundamentales para la correcta funcionalidad vascular. Así, el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con los núcleos de Fe-S de grupos hemo presentes en moléculas como la aconitasa (Han y col., 2005a), alterando su actividad y, por lo tanto, el correcto funcionamiento del metabolismo mitocondrial. Por otro lado, el $O_2^{\cdot-}$ también contribuye a la activación de mecanismos apoptóticos e induce la expresión de genes implicados en la inflamación vascular a través de la activación de factores de transcripción sensibles al estado redox celular como NFκB o AP-1 (Bowie y O´Neill, 2001; Taniyama y Griendling, 2003; Lin y col., 2005).

1.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El H_2O_2 es otra especie reactiva de oxígeno activadora de la expresión de genes de respuesta temprana implicados en la inflamación y el estrés oxidativo asociada a muchas patologías cardiovasculares. El H_2O_2 procede de la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ por las SODs, lo que indica que la acción detoxificante de eliminar un ROS como el $O_2^{\cdot-}$ lleva implícita la generación de otro, el H_2O_2. Puesto que el H_2O_2 procede del $O_2^{\cdot-}$ y que como Zafari y col. (1998) demostraron la NAD(P)Hox genera directamente H_2O_2, parece lógico pensar que la principal fuente implicada en el incremento de H_2O_2 sea este este complejo enzimático.

La multitud de rutas de señalización que, como veremos mas adelante, son capaces de ser reguladas por el H_2O_2 hace que la regulación de sus niveles sea clave para el correcto funcionamiento celular (Blanc y col., 2003; Cai, 2005). Al igual que el anión superóxido, la síntesis de H_2O_2 debe ser regulada tanto a nivel de su producción como a nivel de su eliminación. Así, las células desarrollan sistemas detoxificantes como la catalasa para reducir los niveles de H_2O_2. 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, con una eficacia muy alta en situaciones de alto estrés oxidativo, protegiendo a la célula del H_2O_2 intracelular y, por lo tanto, de forma indirecta, del $O_2^{\cdot-}$ (Muzykantov, 2001; Wassman y col., 2004).

Al igual que el anión superóxido, el H_2O_2 activa factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la inflamación, la proliferación celular y el propio incremento del estrés oxidativo, como son los integrantes del complejo AP-1 o NFκB (Barchowsky y col., 1995; Mendes y col., 2003; Li y col., 2006a). Además, el H_2O_2 es un factor clave en la activación de p38MAPK, JNK y ERKs (Guyton y col., 1996), lo que sitúa a esta ROS como un importante mediador de los efectos observados en respuesta a estímulos como la angiotensina II (Zafari y col., 1998; Griendling y col., 2000; Dikalov y col., 2008). Además, el H_2O_2 contribuye al aumento en la permeabilidad vascular (Siflinger-Birnboim y col., 1992), regula la expresión de citoquinas como la IL-8 (De Oliveira-Marques y col., 2007), el TNFα (Nakao y col., 2008), de moléculas de adhesión celular como ICAM-1 (Lo y col., 1993) y VCAM-1 (Lee y col., 2008), de enzimas proinflamatorios como COX-2 (Nakamura y Sakamoto, 2001; Lu y Wahl, 2005; Cao y col., 2006) y de factores de crecimiento como VEGF (Lee y col., 2006).

A nivel funcional, el H_2O_2 es un importante modulador de la respuesta fisiológica vascular, ya que ha sido identificado en algunos lechos vasculares como el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF) con propiedades vasodilatadoras (Yada y col., 2003; Shimokawa y Matoba, 2004); en este caso, la acción de las SODs tendrían como consecuencia el intercambio enzimático de un ROS implicado en el aumento de las respuestas vasoconstrictoras por otro asociado con un aumento en las relajaciones

dependientes de endotelio (Shimokawa y col., 2003; Morikawa y col., 2003). Sin embargo, sus acciones vasculares son dependientes del lecho vascular analizado, ya que el H_2O_2 puede provocar también vasoconstricción (Rodríguez-Martínez y col., 1998; Hernanz y col., 2003; Gao y col., 2005). Completando el abanico de posibilidades, también se ha descrito la existencia de respuestas bifásicas en presencia de H_2O_2 en arterias de resistencia, en las cuales el componente vasoconstrictor de esta respuesta se relaciona con un incremento en la producción de anión superóxido inducida por el propio H_2O_2 (García-Redondo y col., 2009).

1.3. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ROS

En distintos modelos de hipertensión vascular se observa un incremento en el estrés oxidativo, debido tanto a un aumento en la producción de ROS (Rajagopalan y col., 1995; Zalba y col., 2000; Wu y col., 2001; Beswick y col., 2001a; 2001b; Zhou y col., 2003; Schiffrin y Touyz, 2004; Lee y Griendling, 2008) como a una reducción en la actividad de los sistemas antioxidantes (Redón y col., 2003; Chaves y col., 2007). La angiotensina II, cuyos niveles se encuentran elevados con la hipertensión, es uno de los principales mediadores que participan en el incremento del estrés oxidativo. Así, tanto en cultivos celulares (Seshiah y col., 2002; Beltrán y col., 2009) como en modelos animales (Rajagopalan y col., 1995; Zalba y col., 2000), el tratamiento con angiotensina II provoca un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$. El incremento en el estrés oxidativo inducido por la alta actividad del sistema renina-angiotensina en la hipertensión se debe a un aumento en la actividad de la NAD(P)Hox. Esto se deduce de los siguientes hallazgos; 1) la angiotensina II induce tanto la expresión como la activación de la NAD(P)Hox (Zalba y col., 2000; Viedt y col., 2000), 2) ratones deficientes en el gen de la subunidad NOX-1 de la NAD(P)Hox producen menos anión superóxido frente a la estimulación con angiotensina II (Matsuno y col., 2005), y 3) ratones que sobreexpresan NOX-1 en CMLV producen mayores niveles de anión superóxido (Dilakova y col., 2005). Por otra parte, tanto la producción de $O_2^{\cdot-}$ como la expresión de p22phox es superior en aorta de ratas SHR que en WKY, normalizándose los niveles tras el tratamiento con antagonistas de los receptores AT-1 (Zalba y col., 2000). Similares resultados se obtuvieron en el modelo de ratas en el cual se indujo la hipertensión con acetato de deoxicorticosterona (ratas "DOCA-*Salt*") (Beswick y col., 2001a; Callera y col., 2006).

El incremento en la producción de ROS observado en la hipertensión puede contribuir al desarrollo de las alteraciones descritas en esta patología debido a que el remodelado vascular y el incremento en las respuestas vasoconstrictoras asocian con el aumento en la actividad de la NAD(P)Hox, y a que las especies reactivas de oxígeno participan en la activación de p38MAPK y JNK inducida por distintos estímulos, incluyendo angiotensina II (Viedt y col., 2000) o endotelina-1 (Kyaw y col., 2002). Por otra parte, el estado inflamatorio crónico asociado a la hipertensión (Suzuki y col., 2003; Pauletto y Rattazzi, 2006; Marchesi y col., 2008) es dependiente de la producción de ROS, ya que la inducción de la expresión de citoquinas y enzimas proinflamatorias como COX-2 requiere la activación de factores de transcripción redox sensibles como NFκB, AP-1 o la cascada JAK-STATs (Chun y Suhr, 2004; Grau y col., 2005; Tsatsanis y col., 2006; DeStefano y col., 2007). Contribuyendo al estado inflamatorio asociado a la patología hipertensiva se encuentra el aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular como VCAM-1 (Constanzo y col., 2003). Puesto que tanto en cultivos de CMLV (Tummala y col., 2000) como en células endoteliales (Pueyo y col., 2000) el incremento en la expresión de este marcador de inflamación es dependiente de la activación

de NFκB, el estrés oxidativo también podría estar contribuyendo al desarrollo del fenotipo inflamatorio incrementando la adhesión leucocitaria. Por otra parte, la disfunción endotelial y el aumento en la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores descritos en la hipertensión también se relaciona con el aumento en el estrés oxidativo (Beswick y col., 2001a; Álvarez y col. 2007; 2008a). Así, el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ puede reducir la biodisponibilidad del NO sintetizado por la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS) reduciendo, por tanto, la vasodilatación dependiente de endotelio. Además, la reacción entre $O_2^{\cdot-}$ y NO genera $ONOO^-$, el cual contribuye a la reducción de los niveles de PGI_2 y, por lo tanto, al incremento de las respuestas vasoconstrictoras (Bachschmid y col., 2003; Schildknecht y Ullrich, 2008), además de activar rutas de señalización celular implicadas en el estrés o en el remodelado vascular como JNK, MMPs o moléculas de adhesión celular proinflamatorias (Paravicini y Touyz, 2006).

2. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

El sistema renina-angiotensina (RAS) juega un papel fundamental en el desarrollo de diversas patologías cardiovasculares. El incremento tanto en los niveles como en el grado de activación de los integrantes de este sistema ha sido descrito en la aterosclerosis (Hammoud y col., 2007), la diabetes (McGuire y col., 2008) y la hipertensión (Ruiz-Ortega y col., 2006; Boos y Lip, 2006; Kobori y col., 2007). El sistema renina-angiotensina fue considerado originariamente como un sistema estrictamente circulante; sin embargo, con el paso del tiempo se han incrementado los datos a favor de su ubicuidad, detectándose sus componentes en tejidos y órganos como el cerebro, el riñón, la corteza adrenal, el corazón o la propia pared vascular (Touyz y Schiffrin, 2000; Bader y col., 2001; Kobori y col., 2007).

Uno de los componentes del RAS, la renina, es liberada al plasma por las células yuxtaglomerulares renales, donde por proteólisis se transforma en renina activa (Lumbers, 1999). Por otro lado, el angiotensinógeno es sintetizado principalmente a nivel hepático y secretado al torrente circulatorio, donde la renina lo hidroliza, formando el decapéptido conocido como angiotensina I. Esta angiotensina I será utilizada como sustrato por la enzima conversora de angiotensina (ECA) generando el octapéptido angiotensina II (Fig. 5).

Aunque la angiotensina II es el principal péptido vasoactivo del sistema renina-angiotensina, otros péptidos con actividad vascular pueden ser generados a partir de ella. Así, la proteólisis de la angiotensina II llevada a cabo por la aminopeptidasa A origina el hexapéptido angiotensina III, el cual aún puede ser sustrato de la aminopeptidasa N, generando el péptido angiotensina IV. Sin embargo, la complejidad del sistema renina-angiotensina aún puede ir más allá, ya que a su vez la angiotensina II, además de ser sustrato de las aminopeptidasas, también puede servir como sustrato de otra isoforma de la ECA, la ECA-2, la cual es capaz de generar angiotensina 1-7 (Fig. 5). La angiotensina 1-7, a diferencia de la angiotensina II, ejerce efectos vasodilatadores, sugiriendo que este péptido podría estar activando mecanismos de compensación frente a los efectos vasoconstrictores y proinflamatorios ejercidos por la angiotensina II (Ferrario, 2006). De acuerdo con esto, ratones que no expresan ECA-2 muestran un incremento en la inflamación y en el estrés oxidativo (Oudit y col., 2007). Adicionalmente, la ECA-2 también puede utilizar como sustrato angiotensina I generando angiotensina 1-9, péptido regulador de la agregación plaquetaria, y que por acción de la ECA también puede transformarse en angiotensina 1-7 (Lumbers, 1999; Bader y col., 2001; Kramkowski y col., 2006; Kobori col., 2007).

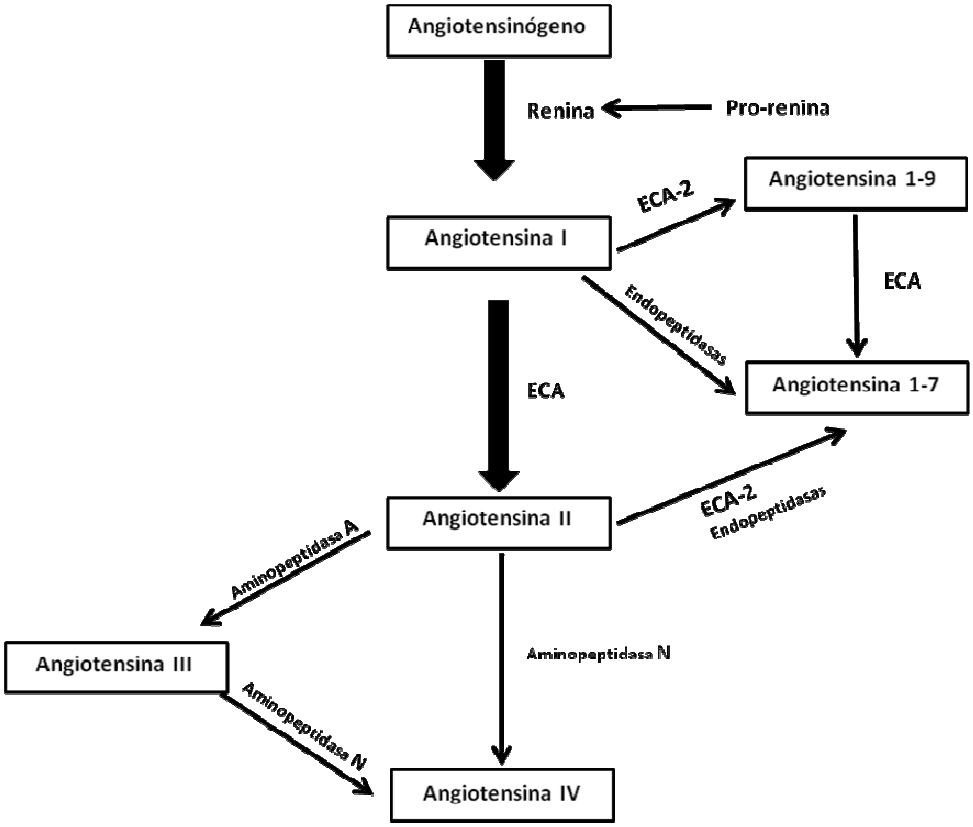


Fig. 5: Sistema renina-angiotensina. ECA: Enzima conversora de angiotensina.

A nivel fisiológico, la angiotensina II induce vasoconstricción, liberación de catecolaminas, secreción de vasopresina y aldosterona, modula la ingesta de agua y la excreción renal de Na^+ e incrementa la actividad del sistema nervioso simpático (Lumbers, 1999; Bader y col., 2001; Kobori y col., 2007). Sin embargo, la angiotensina II presenta también propiedades proinflamatorias que incluyen la producción de ROS (Beltrán y col., 2009), de citoquinas proinflamatorias (Sanz-Rosa y col., 2005a), de moléculas de adhesión (Jiang y col., 2004a) y de prostanoides derivados de COX-2 (Álvarez y col., 2007) (Fig. 6).

La angiotensina II, ejerce sus acciones a través de la activación de dos tipos de receptores de membrana acoplados a proteínas G, los receptores AT-1 y los AT-2. La mayoría de las acciones hipertensivas y proinflamatorias son ejercidas a través de la interacción con receptores AT-1 (Touyz y Schiffrin, 2000). Los receptores AT-1, de los cuales se han caracterizado y clonado dos isoformas, AT-1a y AT-1b, se expresan en muchos tejidos incluyendo riñón, glándulas adrenales y sistema cardiovascular, localizándose además en todos los tipos celulares de la pared del vaso (Murphy y col., 1991; Sasamura y col., 1992; Ito y col., 1995). Los receptores AT-2 se expresan mayoritariamente en tejidos fetales, reduciéndose sus niveles según avanza el desarrollo, aunque su expresión es detectable en órganos reproductores, páncreas, riñón, médula, corazón y, al igual que los AT-1, en la vasculatura (Touyz y Schiffrin, 2000). Otros dos tipos de receptores han sido descritos, los AT-3 y los AT-4. Los receptores AT-3 fueron caracterizados en células de neuroblastoma y sólo se ha descrito su presencia en líneas celulares. Este receptor reconoce angiotensina II, pero no es

inhibido por losartán o PD123319, antagonistas de los receptores AT-1 y AT-2, respectivamente. Por último, el AT-4 es expresado en corazón, pulmón, hígado, riñón y cerebro y puede unir angiotensina IV con alta afinidad. Al igual que los AT-3, los receptores AT-4 tampoco presentan afinidad por losartán o PD123319 (De Gasparo y col., 1995; 2000). A día de hoy las rutas de señalización activadas por este receptor son una incógnita, ya que no parece estar acoplado a proteínas G y se desconoce tanto la función del dominio de unión del ligando como sus sitios de regulación, lo que hace que, al igual que los receptores AT-3, su inclusión en la clasificación de receptores de angiotensina de la *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR) aún permanezca en el aire (IUPHAR *database of angiotensin receptors*, 2008).

La activación de los receptores AT-1 por la angiotensina II estimula la hidrólisis del PIP_2 (inositol 4,5-bifosfato) por la PLC (fosfolipasa C), provocando la liberación de Ca^{2+} y la contracción de las CMLV (Fig. 6). Además, la angiotensina II activa la familia de proteínas tirosín quinasas denominadas Src o de otras tirosín quinasas responsables de la activación de factores de transcripción como STATs, así como de la PI3K (proteína fosfatidilinositol-3-quinasa), Rho kinasa y de MAPKs, como ERK 1/2, JNK, JAK (proteín quinasa Janus), o p38MAPK. Todos estos mecanismos van a explicar los efectos mediados por la angiotensina II a través de los receptores AT-1 sobre la contracción, el crecimiento celular y la expresión de marcadores inflamatorios (Touyz y Schiffrin, 2000) (Fig. 6). La activación de los receptores AT-2, al contrario de lo que sucede con la activación de los AT-1, puede mediar respuestas vasodilatadoras a través de mecanismos que implican la producción de NO, la liberación de nucleótidos cíclicos (Horiuchi y col., 1999; Touyz y Schiffrin, 2000) o la activación de proteín-tirosín fosfatasas como SHP-1 (Álvarez y col., 2008b), las cuales regulan negativamente la activación de MAPK como ERK o JNK (Lee y Esselman, 2002).

El aumento en la presión arterial debido al incremento en la actividad del RAS está relacionado no sólo con la capacidad de sus péptidos vasoactivos de producir vasoconstricción y estimular la liberación de aldosterona, sino también con el aumento en el estrés oxidativo que producen. El hecho de que la inhibición de la NAD(P)Hox y, por lo tanto, la reducción en los niveles de anión superóxido inducidos por la perfusión de angiotensina II, se traduzca en una reducción de la presión arterial confirma esta aseveración (Rey y col., 2001). Por otra parte, el incremento en la producción de prostanoides inducido por angiotensina II a través de receptores AT-1 puede también jugar un papel determinante en la modulación del tono vascular. El aumento en la producción de prostanoides inducido por la angiotensina II es ejercido a varios niveles: 1) la angiotensina II activa rutas de señalización implicadas en la expresión de COX-2 (Ohnaka y col., 2000; Hu y col., 2002; Beltrán y col., 2009), 2) la angiotensina II incrementa la expresión de COX-2 por mecanismos dependientes del incremento en el estrés oxidativo (Álvarez y col., 2007), y 3) la angiotensina II es capaz de activar la PLA_2, enzima catalizadora de la síntesis de ácido araquidónico, incrementando los niveles del sustrato inicial y, por lo tanto, la actividad de COX-2 (Freeman y col., 1998). Además de su capacidad para regular la expresión de COX-2, la angiotensina II también puede contribuir al incremento en la permeabilidad vascular y la inflamación induciendo la expresión de esta enzima y aumentando los niveles de TXA_2, prostanoide que como Valentín y col. (1997) demostraron, está implicado en el aumento de la permeabilidad vascular.

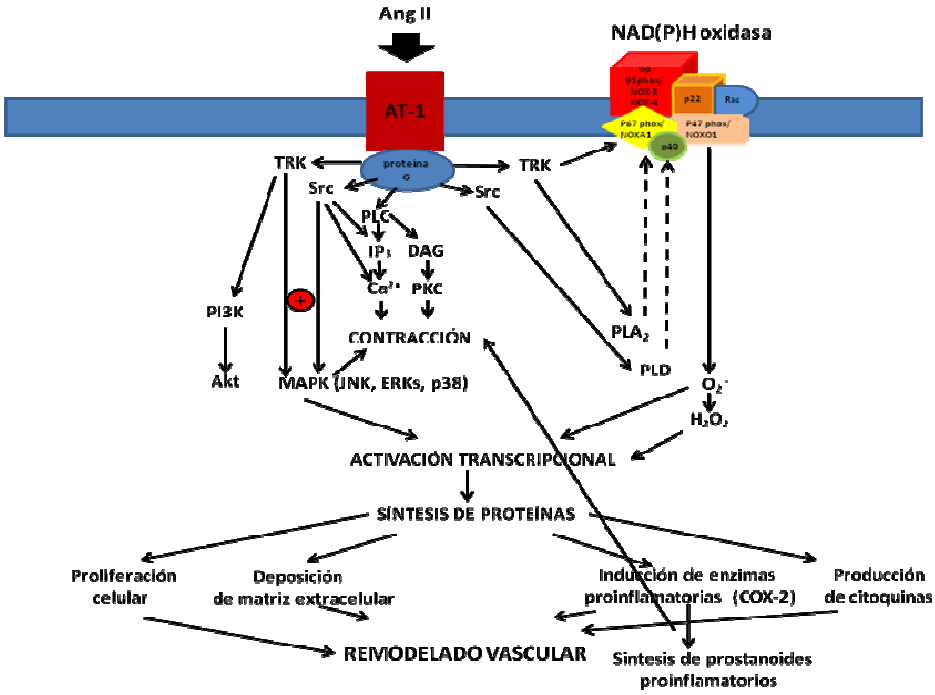


Fig. 6: Esquema ilustrativo de las principales rutas de señalización celular activadas por angiotensina II. Ang II: angiotensina II, IP_3: inositol 1,4,5-trifosfato, DAG: diacilglicerol, ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares, JNK: proteín quinasa del extremo N terminal de c-Jun, MAPK; proteín quinasas activadas por mitógenos, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa, PKC: proteín quinasa C, PLC: fosfolipasa C, PLD: fosfolipasa D, TRK: proteín-tirosín kinasas.

2.1. ANGIOTENSINA II COMO MEDIADOR PROINFLAMATORIO

Además de las acciones ejercidas sobre el tono vascular, la angiotensina II juega un papel clave en la activación de mecanismos relacionados con la inflamación vascular (Fig. 7). Así, la angiotensina II induce la expresión de una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias como IL-8 (interleuquina 8) y MCP-1 (Hernandez-Presa y col., 1998), IL-6 (Schieffer y col., 2000), IP-10 (proteína inducible por interferón 10) (Ortego y col., 1999), osteopontina (Abe y col., 2008), RANTES (Antus y col., 2001), CD11b (Mateo y col., 2006) e incluso de otros agentes vasoconstrictores y proinflamatorios como la endotelina-1 (Hong y col., 2004). Adicionalmente a la inducción de la expresión de mediadores proinflamatorios, la angiotensina II es capaz de inducir la expresión de VEGF (Sánchez-López y col., 2005), integrinas (Li y col., 2006b), VCAM-1 e ICAM-1 (Pastore y col., 1999; Tummala y col., 1999), selectina-E y selectina-P (Álvarez y col., 2004), tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", contribuyendo al aumento en la adhesión leucocitaria y la infiltración en la pared vascular de células del sistema inmune. Esto se confirma por el hecho de que la inhibición del RAS reduce la expresión de marcadores de inflamación como CD 40-L, selectina-P, IL-8 y MCP-1, reduciendo además marcadores de activación linfocitaria al igual que la infiltración de macrófagos, eventos todos ellos asociados al desarrollo de patologías vasculares como la hipertensión, aterosclerosis e hiperlipidemias (Chen y col., 2001; Martin y col., 2004; Koh y col., 2006; Kim y col., 2008).

La mayoría de los efectos ejercidos por la angiotensina II sobre la expresión de genes proinflamatorios se deben a la activación de factores de transcripción, entre los que cabe destacar NFκB (Han y col., 1999; Ruiz-Ortega y col., 2000; Pueyo y col., 2000; Zahradka y col., 2002), cuya activación por angiotensina II

puede ser mediada tanto a través de receptores AT-1 como de AT-2 (Ruiz-Ortega y col., 2001). Otros factores de transcripción como el complejo AP-1 (Browatzki y col., 2000), Ets-1 (Abe y col., 2008), STATs (Schieffer y col., 2000), NFAT (Fujii y col., 2005) o CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc) (Pham y col., 2008; Beltrán y col., 2009) son también activados por la angiotensina II y contribuyen a la expresión de genes proinflamatorios y al remodelado vascular asociado (Fig. 7).

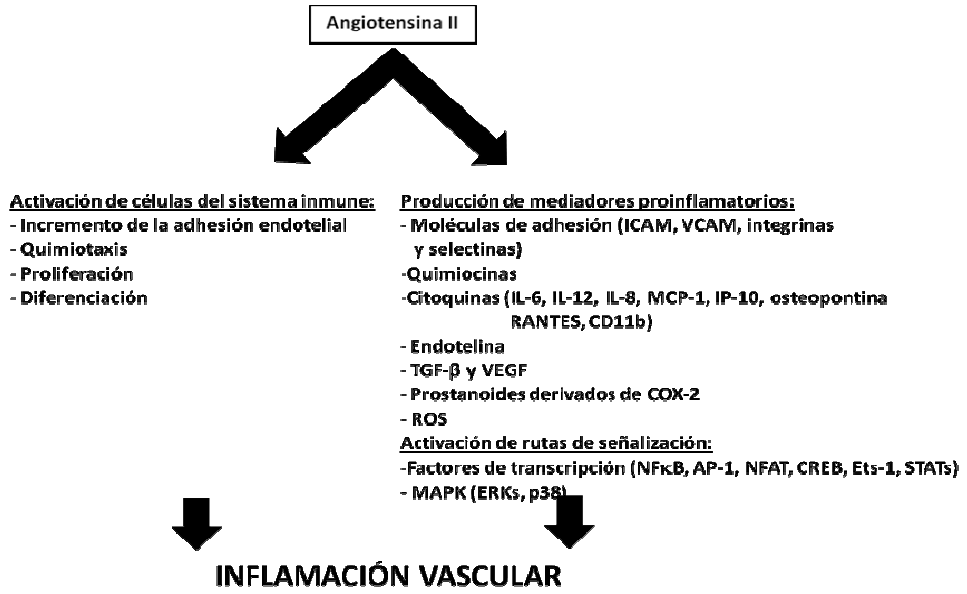


Fig. 7: Efectos de la angiotensina II sobre la respuesta inflamatoria. AP-1: proteína activadora 1, CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc, ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares, ICAM: molécula de adhesión celular inducible, IL-6: interleuquina 6, IL-8: interleuquina 8, IL-12: interleuquina 12, IP-10: proteína inducible por interferón, MAPK: proteín quinasas activadas por mitógenos, MCP-1: proteína quimioatractiva de macrófagos, NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados, NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B, ROS: especies reactivas de oxígeno, STATs: proteínas transductoras de señal y activadoras de transcripción, TGF-β: factor de crecimiento transformante β, VCAM: molécula de adhesión celular vascular, VEGF: factor de crecimiento de endotelio vascular (adaptado de Suzuki y col., 2003).

Las alteraciones estructurales inducidas por la angiotensina II están íntimamente asociadas con su actividad proinflamatoria, ya que el daño vascular causado por los mediadores inflamatorios induce mecanismos compensatorios de recuperación en la pared del vaso. Entre estos mecanismos encontramos la fibrosis vascular o la activación de mecanismos de hipertrofia (Zhao y col., 2009), hiperplasia (Muthalif y col., 2002) o apoptosis de CMLV (Suzuki y col., 2002). La angiotensina II activa procesos fibróticos en la pared vascular incrementando la deposición de proteínas de matriz extracelular como colágeno o fibronectina, ya sea incrementando su síntesis o reduciendo su degradación (Mezzano y col., 2001; Castoldi y col., 2002; Marchesi y col., 2008). Aunque existen efectos profibróticos vasculares llevados a cabo por la angiotensina II independientes de la activación de TGF-β (Rodriguez-Vita y col., 2005), este factor es un intermediario clave en el incremento en la deposición de matriz extracelular y los fenómenos de hipertrofia inducidos por este péptido (Wang y col., 2006a). Además, la regulación del ciclo celular llevada a cabo por la angiotensina II también depende del tipo de receptor, ya que la activación de los receptores AT-1 parece relacionarse más con la activación del crecimiento celular (Zhao y col., 2009), mientras que la de los AT-2 se asocia con su inhibición (Suzuki y col., 2002).

2.2. ANGIOTENSINA II Y ESTRÉS OXIDATIVO

El aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ es un fenómeno ampliamente descrito tanto en modelos animales como en pacientes hipertensos y la angiotensina II es una de las principales moléculas implicadas en este aumento (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000; Seshiah y col., 2002; Zhou y col., 2003; Álvarez y col., 2007). La activación por angiotensina II de la principal fuente enzimática vascular de ROS, la NAD(P)Hox, es un evento íntimamente asociado a la hipertensión. Así, en aortas procedentes de ratas hipertensas se observa un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y en la expresión de la subunidad de la NAD(P)Hox p22phox, eventos que se normalizan tras el bloqueo de los receptores AT-1 (Zalba y col., 2000). Por otro lado, estudios llevados a cabo tanto "*in vivo"* como "*in vitro"* en distintos modelos de hipertensión revelan que la disfunción endotelial asociada a esta patología está también relacionada con el aumento en el estrés oxidativo producido por angiotensina II. Así, Zhou y col. (2003) describieron que el tratamiento con candesartán reducía la producción de $O_2^{\cdot-}$ y mejoraba la disfunción endotelial. Similares resultados obtuvieron Álvarez y col. (2007) en aorta de ratas SHR tratadas con losartán, sugiriendo que la producción de anión superóxido inducida por angiotensina II podría ser responsable de la reducción en los niveles de NO y, por lo tanto, del deterioro en las relajaciones dependientes de endotelio observados en la hipertensión.

Existe una íntima relación entre los efectos proinflamatorios ejercidos por la angiotensina II y su capacidad para incrementar la producción de ROS. En este sentido, el incremento en el estrés oxidativo inducido por la angiotensina II parece ser uno de los principales mecanismos implicados en la respuesta inflamatoria inducida por este péptido a través de la activación de factores de transcripción redox sensibles como el heterodímero AP-1 (Wu y col., 2005b) o NFκB (Ruiz-Ortega y col., 2000; Bowie y O´Neill, 2000; Sanz-Rosa y col., 2005a; 2005b). Puesto que la angiotensina II activa la NAD(P)Hox a través de receptores AT-1 (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000) y las ROS generadas median la activación de estos factores de transcripción (Beswick y col., 2001; Zhou y col., 2003; Wu y col., 2005b; Pueyo y col., 2008), la regulación de la expresión de genes proinflamatorios producida por angiotensina II podría ser dependiente del incremento en el estrés oxidativo (Pueyo y col., 2000; Álvarez y col., 2007). Reforzando esta hipótesis se encuentra el hecho de que la activación de p38MAPK y Akt (Ushio-Fukai y col., 1998; 1999), JAK-STATs (Schieffer y col., 2000), JNK (Viedt y col., 2000; Ding y col., 2007) o ERK 1/2 (Touyz y col., 2001b) en CMLV estimuladas con angiotensina II y el incremento en la síntesis de colágeno observado en ratas perfundidas con este mismo péptido también parece ser dependiente del incremento en el estrés oxidativo (Zhao y col., 2008).

Muchos de los efectos vasculares ejercidos por la angiotensina II podrían ser también mediados por la inducción de la expresión de endotelina-1 (An y col., 2007), péptido vasoconstrictor que también contribuye a incrementar el estrés oxidativo a través de la activación de la NAD(P)Hox (Dammanahalli y Sun, 2008).

2.3. ANGIOTENSINA II COMO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE COX-2

La capacidad de la angiotensina II para inducir la expresión de COX-2 y la producción de prostanoides tanto a nivel renal (Jaimes y col., 2008) como vascular (Ohnaka y col., 2000; Álvarez y col., 2007; Beltrán y col., 2009) puede desempeñar un papel clave para explicar su actividad proinflamatoria, profibrótica y

vasoconstrictora. En relación con esto, nuestro grupo ha descrito un incremento en la participación de prostanoides contráctiles en la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina en ratas SHR, debido al incremento en la expresión de COX-2 inducido por la mayor activación del sistema renina-angiotensina en estas ratas (Álvarez y col., 2007). Este incremento en la expresión de COX-2 y en los niveles de prostanoides como PGE_2 también se observó a nivel renal en ratas perfundidas con angiotensina II (Hernandez y col., 2002) y en distintos tipos celulares de la pared vascular expuestos a angiotensina II incluyendo CMLV y fibroblastos adventiciales (Ohnaka y col., 2000; Hu y col., 2002, Beltrán y col., 2009). Como se ha observado en CMLV (Ohnaka y col., 2000) o en fibroblastos perivasculares (Beltrán y col., 2009) la inducción de la expresión de COX-2 por angiotensina II se lleva a cabo a través de la activación de receptores AT-1, siendo importante en este proceso la internalización del propio receptor (Morinelli y col., 2008). Además, a pesar del incremento en la actividad de la PLA_2 por angiotensina II descrito por Freeman y col. (1998), la inducción de la expresión de COX-2 mediada por este péptido es independiente de este hecho (Hu y col., 2002). Sin embargo, aunque la mayoría de la bibliografía describe a la angiotensina II como un estímulo inductor de COX-2, este efecto parece también ser dependiente del tejido en análisis. Así, Wolf y col. (1999) y Cheng y col. (1999) observaron a nivel renal que la angiotensina II también puede reducir la expresión de COX-2.

La angiotensina II puede inducir la expresión de COX-2 a través de mecanismos dependientes del incremento del estrés oxidativo. Así, el aumento en la actividad de la NAD(P)Hox y en la producción de anión superóxido inducida por angiotensina II tanto en CMLV de aorta como a nivel de la corteza renal, parece jugar un papel clave en la regulación de la expresión de esta enzima (Álvarez y col., 2007; Jaimes y col., 2008). Sin embargo, la relación entre el incremento del estrés oxidativo y la inducción de COX-2 por angiotensina es dependiente del tipo celular en estudio; así, Beltrán y col. (2009) observaron en fibroblastos adventiciales que a pesar de que la angiotensina II inducía la expresión de COX-2 y la producción de $O_2^{\cdot-}$, el primer efecto era independiente del segundo.

La regulación de la expresión de COX-2 por angiotensina II se lleva a cabo fundamentalmente por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. Así, la angiotensina II induce la expresión de COX-2 a nivel transcripcional debido a su capacidad para activar factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 (Wu y col., 2005b) o NFκB (Ruiz-Ortega y col., 2000; Sanz-Rosa y col., 2005a; 2005b), los cuales presentan sitios de unión funcionales en el promotor de COX-2 y, por lo tanto, regulan su expresión (Simmons y col., 2004; Chun y Suhr, 2004; Grau y col., 2004; Tsatsanis y col., 2006). Puesto que, como se ha comentado previamente, tanto NFκB como AP-1 son sensibles al estado redox celular (Bowie y O´Neill, 2000; Wu y col., 2005b) y la angiotensina II incrementa la producción de ROS (Zalba y col., 2000; Seshiah y col., 2002; Álvarez y col., 2007), parece lógico pensar que el incremento en la expresión de COX-2 inducido por la angiotensina II se relacione con el incremento del estrés oxidativo inducido por ésta. Además, el hecho de que la angiotensina II puede activar ERK1/2 y p38MAPK y que estas MAPK incrementen la estabilidad del ARNm de COX-2 (Dean y col., 1999; Ohnaka y col., 2000) sugiere que el incremento en la expresión de COX-2 también podría llevarse a cabo por mecanismos relacionados con el aumento de la vida media de su transcrito.

3.- PROSTANOIDES E HIPERTENSION

Los prostanoides se descubrieron en los años 30 por Goldblatt y Von Euler en el fluido seminal, partiendo de la observación de su capacidad para modular la contracción y relajación del músculo liso uterino (Mitchell y col., 1995; Simmons y col., 2004). Son una familia de compuestos sintetizados de forma ubicua en el organismo que se caracterizan, fundamentalmente, por su esqueleto de 20 átomos de carbono y su liposolubilidad. Los prostanoides desempeñan un papel clave en la regulación del tono vascular en condiciones fisiológicas, lo que indica que la regulación de la expresión y la actividad de las enzimas implicadas en este proceso son hechos de gran relevancia. La principal enzima reguladora de la síntesis de prostanoides es la prostaglandin (PG) endoperóxido H sintasa, comúnmente denominada ciclooxigenasa (COX), la cual genera distintos prostanoides a partir del ácido araquidónico. La síntesis de prostanoides comienza con la activación de la PLA_2, primer paso limitante en la síntesis de estas moléculas, a partir de cuya actividad se liberará ácido araquidónico utilizando los fosfolípidos de membrana como sustrato (Fig. 8). COX presenta una actividad dual; de acuerdo con su nombre presenta actividad ciclooxigenasa, pero además posee actividad peroxidasa. A partir de su actividad ciclooxigenasa, COX generará PGG_2 a partir del ácido araquidónico, la cual será reducida por su actividad peroxidasa generando PGH_2. Esta PGH_2 será la molécula precursora de la síntesis del resto de prostanoides, que serán generados en los distintos tipos celulares en función de las isomerasas existentes en los mismos. Así, dependiendo del prostanoide sintetizado encontramos la PGD sintasa, PGF sintasa, PGE sintasa, PGI sintasa y TXA_2 sintasa (tromboxano sintasa) (Smith y col., 1991; Mitchell y col., 1995; 1999) (Fig. 8). Todas estas isomerasas son expresadas en la pared del vaso, por lo que todos los prostanoides pueden ser sintetizados a nivel vascular (Tang y Vanhoutte, 2008). Los prostanoides mejor caracterizados son PGE_2, $PGF_{2\alpha}$, PGD_2, PGI_2 o prostaciclina y TXA_2. Además de los prostanoides sintetizados por la COX, los isoprostanos, como el 8-isoprostano $PGF_{2\alpha}$, son derivados del ácido araquidónico con propiedades vasoconstrictoras generados por reacciones no catalizadas enzimáticamente (Cracowski y col., 2001).

Los prostanoides liberados ejercen su función en las células diana uniéndose a sus receptores específicos: TP para el TXA_2, IP para PGI_2, FP para $PGF_{2\alpha}$, DP para PGD_2 y cuatro subtipos de receptores EP ($EP_{1\text{-}4}$) para PGE_2 (Fig. 8). Los receptores IP, DP, EP_2 y EP_4 están acoplados a proteínas G del tipo Gs, capaces de activar la adenilato ciclasa, promoviendo un aumento en los niveles de AMPc y, por lo tanto, la relajación del músculo liso vascular (Fig. 9). Por su parte, los receptores EP_1, TP e IP se acoplan a proteínas Gq capaces de activar de la fosfolipasa C y la formación de IP_3 y diacilglicerol, provocando un aumento en los niveles de calcio intracelular, responsable último de la vasoconstricción. Finalmente, el receptor EP_3 está acoplado a proteínas Gi, cuya activación inhibe la adenilato ciclasa, provocando también vasoconstricción (Wright y col., 2001; Alfranca y col., 2006; Sugimoto y Narumiya, 2007). El 8-isoprostano $PGF_{2\alpha}$ ejerce sus acciones a través de receptores TP.

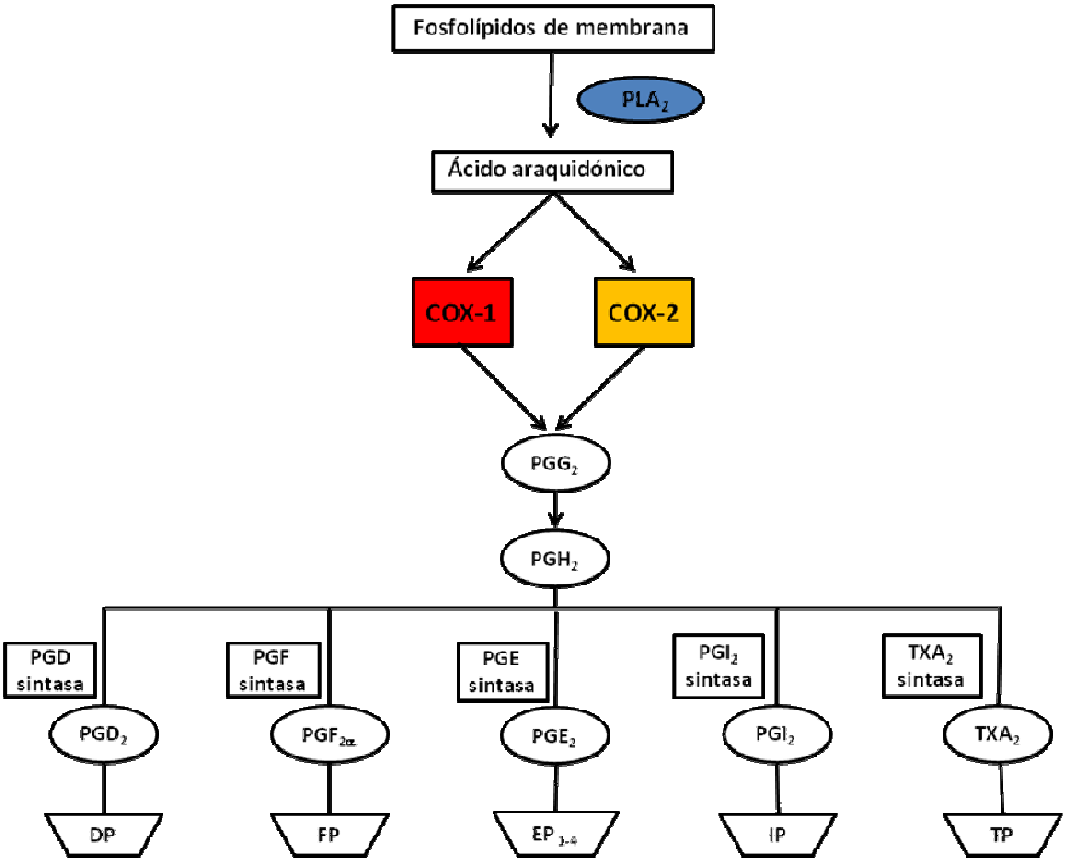
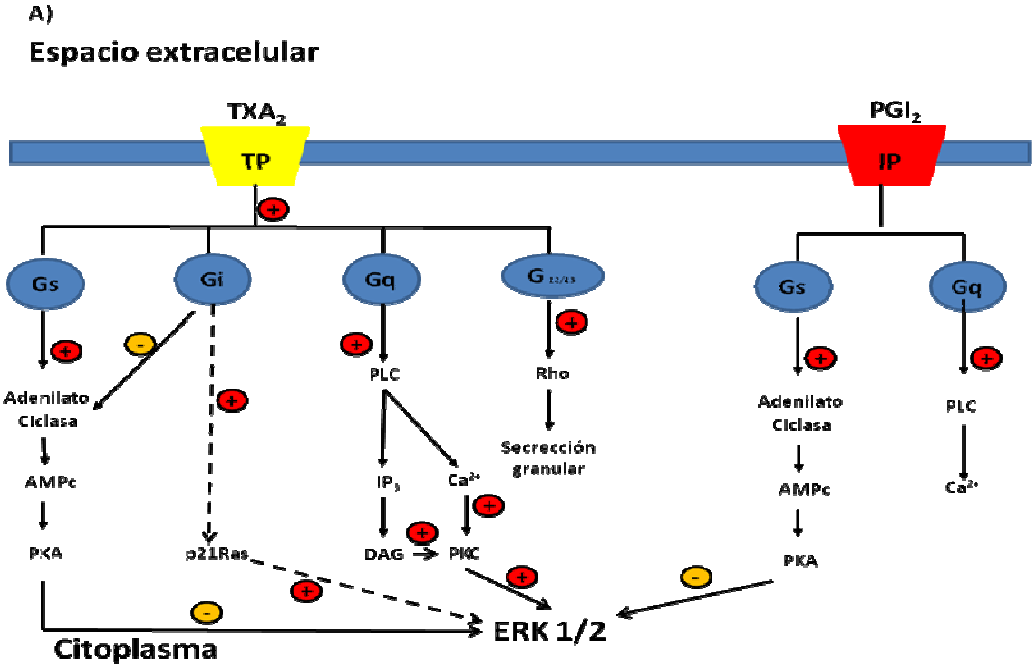


Fig. 8: Esquema de la ruta de síntesis de los prostanoides. DP: receptores de PGD_2, EP_{1-4}: receptores de PGE_2. FP: receptores de $PGF_{2\alpha}$, IP: receptores de PGI_2, PLA_2: fosfolipasa A_2, TP: receptores del tromboxano A_2.



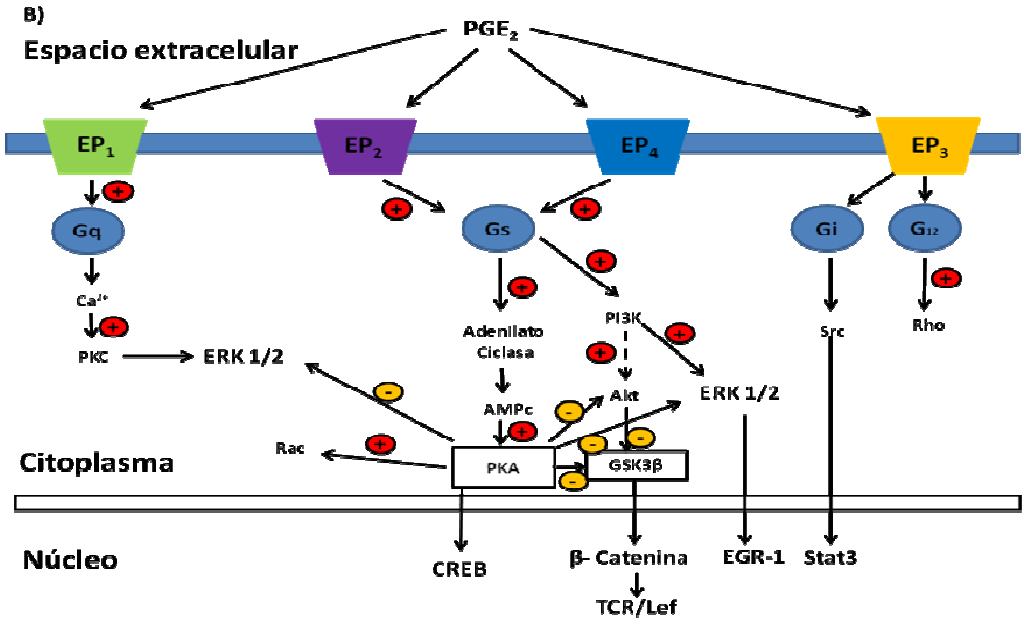


Fig. 9: Rutas de transducción de señal activadas por los principales prostanoides a través de sus receptores celulares específicos. A) Rutas de señalización celular activadas por receptores TP e IP. B) Rutas de señalización celular activadas por receptores EP. DAG: diacilglicerol, EP_{1-4}: receptores de PGE_2, IP: receptor de PGI_2, ERK1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2, IP_3: inositol 1,4,5-trifosfato, PKA: proteín quinasa A, PKC: proteín quinasa C, PLC: fosfolipasa C, TP: receptor del tromboxano A_2 (adaptado de Alfranca y col., 2006).

3.1. CICLOOXIGENASAS

Existen dos isoformas clonadas y caracterizadas de COX, COX-1 y COX-2, las cuales presentan un peso molecular similar (≈ 70 KD) y mas de un 60% de homología entre ellas, con la diferencia de que COX-2 presenta 17 aminoácidos menos en su extremo amino terminal pero 18 más en su extremo carboxilo terminal (Davidge y col., 2001; Warner y col., 2004; Simmons y col., 2004). Los genes que codifican para COX-1 y COX-2 se localizan en los cromosomas 9 y 1, respectivamente, expresándose ambas proteínas en la membrana del retículo endoplasmático y en la envoltura nuclear (Spencer y col, 1998). El gen humano para COX-1 presenta 22 kb, mientras que el de COX-2 presenta 8,3 Kb. COX-1 presenta una estructura característica de genes *housekeeping*; sin embargo, COX-2 es un gen de respuesta temprana, lo que hace que a diferencia de COX-1, presente múltiples sitios de regulación (Fig. 10).

COX-1 fue aislada en 1976 y clonada en 1988 (Simmons y col., 2004). Se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos y está implicada en el mantenimiento de la homeostasis celular. Por otro lado, la expresión de COX-2 es inducible, aunque en ausencia de estímulo puede detectarse en diversos tejidos. Existen varios estudios que muestran expresión constitutiva de esta isoforma en determinadas regiones del riñón y del cerebro (Vane y col., 1998), así como en células vasculares procedentes tanto de arterias de resistencia como de conductancia (Briones y col., 2002; Hernanz y col., 2003; Briones y col., 2005; Álvarez y col., 2005; 2007). En lo referente a su actividad enzimática, el estudio de su estructura terciaria revela que la conformación aminoacídica tanto de sus sitios de reconocimiento de sustrato como de sus regiones catalíticas es similar para ambas isoformas (Picot y col., 1997; Warner y col., 2004; Simmons y col., 2004).

Sin embargo, a pesar de su alta homología estructural y cinética, las dos isoformas varían en su regulación. COX-1 muestra modulación alostérica negativa a bajas concentraciones de ácido araquidónico, sugiriendo que en situaciones donde se induce la expresión de COX-2, como en la inflamación, esta isoforma utiliza preferentemente el ácido araquidónico frente a la isoforma constitutiva y, por lo tanto, cabe considerarla como la principal fuente enzimática responsable del incremento en los prostanoides en estas situaciones patofisiológicas (Warner y col., 2004).

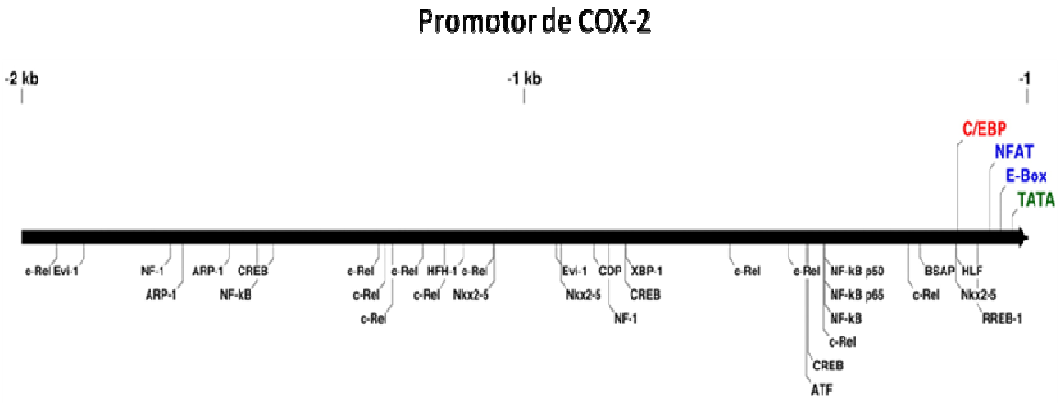


Fig. 10: Esquema del promotor de rata de COX-2, mostrando sus múltiples sitios de regulación. Al igual que en el gen humano y de ratón, en esta región reguladora se pueden encontrar sitios de unión para los principales factores de transcripción proinflamatorios, incluyendo NFκB, AP-1, NFAT, C/EBP o CREB. AP-1: proteína activadora 1, C/EBP: proteína de unión al enhancer CCAAT, CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc, NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados, NFκB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B (tomada de Klein y col., 2007).

En patologías vasculares con un componente inflamatorio como la hipertensión, donde los niveles de citoquinas son elevados, la expresión de COX-2 se podría localizar en la pared vascular, provocando un aumento en los niveles de prostanoides circulantes (Antman y col., 2005). En este sentido, COX-2 se induce por muchas citoquinas proinflamatorias como IL-1β (Briones y col., 2005), TGF-β (El Haroun y col., 2004), TNFα (Sakai y col., 2001), INFγ (Vila-del Sol y Fresno, 2005), lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Hernanz y col., 2004), altas concentraciones de glucosa (Cosentino y col., 2003), factores de crecimiento como VEGF (Tamura y col., 2006), EGF (Slice y col., 2005) e IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1) (Cao y col., 2007) o péptidos vasoactivos circulantes como la angiotensina II (Ohnaka y col., 2000; Álvarez y col., 2007; Beltrán y col., 2009), la bradiquinina (El Haroun y col., 2004) o la endotelina-1 (Peng y col., 2008), lo que permite establecer otro nexo entre la expresión de esta isoforma con el estado de inflamación asociado a diversas patologías vasculares. La inducción de la expresión de COX-2 por estas citoquinas y factores proinflamatorios puede estar vinculada al incremento en el estrés oxidativo. Así, la relación entre el incremento en la producción de ROS, la actividad de la NAD(P)Hox y la expresión de COX-2 ha sido descrita en cardiomiocitos estimulados con LPS (Peng y col., 2005) además de en la corteza renal de ratas hipertensas perfundidas con angiotensina II (Jaimes y col., 2008). Por otro lado, en estados de inflamación vascular la expresión tanto de COX-2 como de la NAD(P)Hox o de iNOS está incrementada (Antman y col., 2005). El incremento en la producción de NO a través de la iNOS, junto a la producción de anión superóxido derivada de la NAD(P)Hox, de la COX o de la propia iNOS provoca un aumento en los

niveles de peroxinitrito, el cual, como ya se comentó inhibe la síntesis de prostaciclina (Bachschmid y col., 2003; Schildknecht y Ullrich, 2008). Además, como mostraron Moon y Befus (2008) en células cebadas derivadas de la médula ósea marrón de ratón, el NO también puede incrementar directamente la expresión de COX-2 incrementando la vida media de su ARNm a través de un mecanismo dependiente de la activación de p38MAPK.

3.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2

La expresión de COX-2 es regulada tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional e incluso postraduccional. La transcripción de COX-2 depende de distintos factores activados por citoquinas y otros mediadores proinflamatorios. Entre éstos, NFκB, el complejo AP-1 formado por c-fos y c-jun, C/EBP o NFAT, los cuales son activados por citoquinas como IL-1β, LPS, TNFα, INFγ o TGF-β, incrementan la transcripción de COX-2 debido a la existencia de sitios de unión para todos ellos en su promotor (Fig. 10) (Simmons y col., 2004; Chun y Suhr, 2004; Grau y col., 2004; Wu y col., 2005a; 2005b; Tsatsanis y col., 2006). Además, en el extremo 5`, el gen de COX-2 presenta elementos de respuesta a AMPc (sitios CRE), sugiriendo un mecanismo de regulación de la expresión de COX-2 por sus propios productos, ya que uno de los efectos vinculados a los prostanoides es el incremento en los niveles de AMPc (Klein y col., 2007) (Fig. 11). La activación de las MAPKs ERK 1/2, JNK y p38 también es un importante factor de la regulación transcripcional de COX-2. Así, en cultivos de fibroblastos adventiciales (Beltrán y col., 2009) y células epiteliales intestinales (Slice y col., 2005), la inducción de la expresión de COX-2 por angiotensina II sólo se reduce en presencia del inhibidor de p38MAPK, sugiriendo que ésta podría ser clave en la expresión de COX-2 inducida por angiotensina II en estos tipos celulares. Sin embargo, en CMLV tanto p38MAPK como ERK 1/2 parecen contribuir al incremento en la expresión de COX-2 inducida por angiotensina II (Ohnaka y col., 2000), indicando que el efecto sobre la regulación transcripcional de la expresión de COX-2 por MAPK es dependiente del tipo celular. Además, el hecho de que en células epiteliales intestinales la expresión de COX-2 inducida por EGF sólo se redujese tras inhibir las ERKs y no p38MAPK (Slice y col., 2005) sugiere que la expresión de COX-2 depende también del estímulo inductor (Fig. 11). A su vez, como se ha observado en condrocitos estimulados con IL-1β, la activación de JNK también contribuye a la regulación de la expresión de COX-2 (Nieminen y col., 2005).

La regulación a nivel postranscripcional también es clave en la expresión de COX-2. En el extremo 3` del ARNm de COX-2 se localizan secuencias AUUUA, denominadas secuencias ARE (elemento rico en AUs), que regulan su estabilidad. Estas secuencias son reconocidas por proteínas como AUF-1 (Cok y col., 2004), HuR (Doller y col., 2007; 2008) o β-catenina (Lee y Jeong, 2006), modificando la estabilidad y la eficiencia traduccional del ARNm. La MAPK p38 también contribuye al incremento de la expresión de COX-2 aumentando la estabilidad de su mensajero y, por tanto, la expresión de éste (Dean y col., 1999; Duque y col., 2006; Di Mari y col., 2007). Del mismo modo, PI3K y PKC (Cao y col., 2007) también participan en el incremento de la expresión de COX-2 a través de mecanismos que implican, además del incremento transcripcional, la estabilización de su ARNm (Fig. 11).

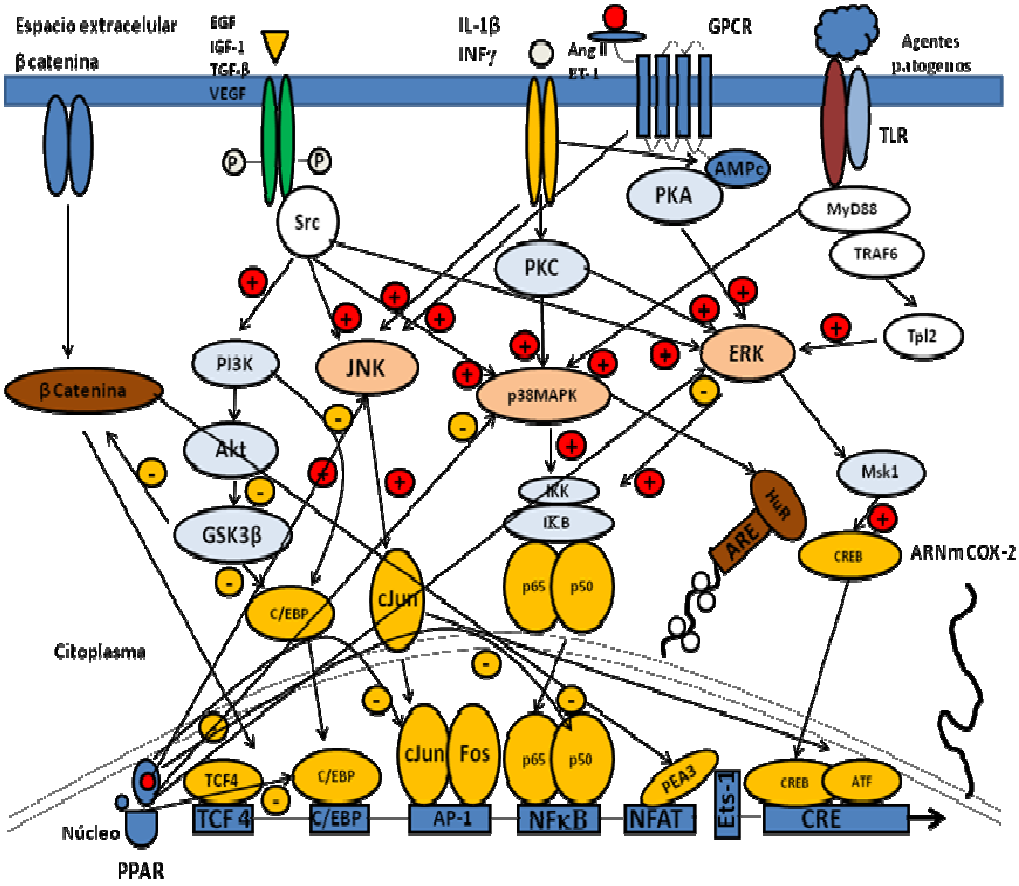


Fig. 11: Esquema mostrando la multitud de rutas de señalización que regulan la expresión de COX-2. Ang II: angiotensina II, AP-1: proteína activadora 1, ARE: elemento rico en AU, ATF: factor de la activación de la transcripción, C/EBP: proteína de unión a la secuencia *enhancer* CCAAT, CRE: elemento de respuesta a AMPc, 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, INFγ: interferon γ, IκB: inhibidor de NFκB, IκK: quinasa de IκB, JNK: quinasa del extremo N terminal de c Jun, MSK-1: proteín quinasa activada por estrés y mitógenos, MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide, NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados, NFκB: factor nuclear activador de la síntesis de la cadena ligera κ de linfocitos B, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa, PKA: proteín quinasa A, PKC: proteín quinasa C, PPAR: receptor activador de la proliferación peroxisomal, TCF-4: factor de células T 4, TGF-β: factor de crecimiento transformante β, Tpl2: locus de progresión tumoral 2, TLR: "*Toll-like*" receptor, TRAF 6: factor asociado al receptor de TNF 6, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (modificado de Tsatsanis y col., 2006).

Estudios realizados con activadores de PPARγ, como más adelante se detallará, han demostrado que este receptor nuclear regula negativamente la expresión de COX-2, debido a su capacidad para interferir con rutas de señalización proinflamatorias como las activadas por NFκB, AP-1 o C/EBP (Subbaramaiah y col., 2001; Simonin y col., 2002; Blanquart y col., 2003; Sanchez-Hidalgo y col., 2005; Ricote y Glass, 2007). La inhibición de p38MAPK y JNK (Desreumaux y col., 2001) así como de ERK 1/2 (Goetze y col., 1999) es otro mecanismo por el cual PPARγ podría llevar a cabo la reducción en la expresión de esta enzima proinflamatoria (Fig. 11).

3.3. FUNCIÓN VASCULAR DE LOS PROSTANOIDES DERIVADOS DE COX-2

Las funciones de los prostanoides cubren un amplio espectro. Así, son mediadores fundamentales, entre otras funciones, en la maduración del óvulo, la inducción al parto, la fiebre, la regulación del sistema inmune, la citoprotección gastrointestinal, la agregación plaquetaria, la broncodilatación y la modulación del tono vascular (Wright y col., 2001; Simmons y col., 2004; Antman y col., 2005; Takahashi y col., 2006; Norel, 2007). A este nivel, los prostanoides contráctiles derivados de COX-2, como el TXA_2 o la $PGF_{2\alpha}$, (Adeagbo y col., 2005; Álvarez y col., 2005; 2007) median respuestas vasoconstrictoras mientras que prostanoides vasodilatadores como PGI_2 están implicados en respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio (Parkington y col., 2004). Por su parte, la PGE_2 puede mediar tanto vasoconstricción como vasodilatación dependiendo del subtipo de receptor que active. Así, la PGE_2 induce vasoconstricción a través de la activación de los receptores EP_1 y EP_3, pero es capaz de mediar vasodilatación por su interacción con receptores EP_2 y EP_4. Aunque la PGE_2 se comporta como vasodilatador en la mayoría de los lechos vasculares, está documentada su capacidad para inducir vasoconstricción en otros (Alfranca y col., 2006; Norel, 2007). Además, la PGE_2 es un prostanoide fundamental en patologías cardiovasculares como la aterosclerosis debido a su capacidad para regular procesos relacionados con el remodelado vascular (Samuelsson y col., 2007). En este sentido, el incremento en la producción de PGE_2 inducido por angiotensina II regula la deposición de proteínas de matriz extracelular a través del incremento de la expresión de las MMPs en los macrófagos de la placa de ateroma, contribuyendo a la estabilización de la misma (Cipollone y col., 2004). La observación hecha por Guo y col. (2008) en CMLV procedentes de aorta de que la angiotensina II incrementaba la expresión de MMP-9, la expresión de COX-2 y la producción de PGE_2 inducida por angiotensina II sugiere que estos efectos podrían ser un mecanismo compensatorio frente al remodelado vascular inducido por este péptido.

Además de las implicaciones previamente mencionadas, COX-2 también regula el remodelado cardiaco y vascular a través de su capacidad para modular mecanismos relacionados con la hipertrofia celular y el remodelado vascular. Está descrito que el aumento en la producción de PGE_2 activa mecanismos implicados en la hipertrofia de miocitos ventriculares (Mendez y LaPointe, 2005) mientras que la inhibición de COX-2 y la deleción del receptor de PGI_2 en arteria carótida de ratón incrementa la hiperplasia y el remodelado vascular atribuyendo a esta PGI_2 derivada de COX-2 un papel importante en la reducción del remodelado vascular (Rudic y col., 2005). Además de la dependencia del órgano diana y de los prostanoides implicados, las alteraciones en la expresión de COX-2 y en la producción de prostanoides dependen incluso del lecho vascular y de la situación fisiopatológica en análisis, puesto que, por ejemplo en células endoteliales de cordón umbilical procedentes de pacientes diabéticos, la reducción en la expresión de COX-2 se traduce en una menor producción del prostanoide vasodilatador PGI_2, lo que contribuye a explicar la disfunción endotelial asociada a la patología diabética (Bolego y col., 2006). Además, el incremento en la producción de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 contribuye al desarrollo de la disfunción endotelial asociada al envejecimiento (Wong y col., 2009). Por lo tanto, la correcta funcionalidad vascular requiere una regulación óptima de la expresión y actividad de COX-2 para mantener un equilibrio entre la síntesis de prostanoides contráctiles y vasodilatadores. De acuerdo con esto, tratamientos con inhibidores selectivos para COX-2 durante periodos de tiempo largos pueden afectar negativamente a la funcionalidad de la vasculatura, debido a la reducción en los niveles de PGI_2 endoteliales (Antman y col., 2005).

3.4. ALTERACIONES CON LA HIPERTENSIÓN EN LA EXPRESIÓN DE COX-2

En pacientes con hipertensión esencial (Taddei y col., 1997) y en distintos modelos animales como ratas SHR (García-Cohen y col., 2000; Briones y col., 2002; Blanco-Rivero y col., 2005; Álvarez y col., 2005; 2007), "DOCA-*Salt"* (Adeagbo y col., 2005) o Dahl "*Salt sensitive*" (Jaimes y col., 2008), o en ratones Cx40 (Krattinger y col., 2008), se ha descrito un incremento en la expresión de COX-2 y en la producción de prostanoides contráctiles. Estos prostanoides están implicados en el incremento de las respuestas vasoconstrictoras y pueden jugar un papel clave tanto en la hipertensión inducida por angiotensina II (Mistri y Nasjletti, 1990), como en la sensible a sal (Jaimes y col., 2008) o en ratas SHR (Álvarez y col., 2005).

Por otro lado, las alteraciones en la expresión de COX-2 asociadas a la hipertensión arterial contribuyen al desarrollo de la disfunción endotelial y justifican el incremento de la resistencia vascular periférica (Taddei y col., 1997; Virdis y col., 2005; Adeagbo y col., 2005; Álvarez y col., 2005; 2007). Blanco-Rivero y col. (2005) demostraron que en ratas WKY y SHR tratadas con aldosterona, la inhibición de COX-2 aumentaba las relajaciones a acetilcolina dependientes de endotelio en ambas cepas, siendo la PGI_2 actuando a través de receptores TP un mediador clave en el efecto observado en los animales hipertensos. Por su parte, Taddei y col. (1997) observaron que en individuos con hipertensión esencial, la mayor actividad de COX-2 bloqueaba la liberación de NO endotelial, confirmando que esta enzima participaba en la reducción de la vasodilatación dependiente de endotelio asociada a la hipertensión.

Algunos autores han relacionado las alteraciones en la vasoconstricción mediada por los productos derivados de COX-2, además de con el incremento en la expresión de la enzima reguladora de sus síntesis, con un aumento en la expresión de sus receptores. Así, Tang y Vanhoutte (2008), encontraron que además de la expresión de COX-2, la expresión de los receptores EP_3 estaba aumentada en CMLV de ratas SHR. Por otro lado, COX-2 contribuye el remodelado vascular característico de esta patología. Así, en un modelo de hipertensión portal inducido por CCl_4, la inhibición de COX-2 redujo los niveles de proteínas de matriz extracelular como colágeno o laminina, sugiriendo que los productos de COX-2 también participan en los procesos fibróticos asociados a la hipertensión (Tu y col., 2007).

Entre los mecanismos implicados en el incremento en la expresión de COX-2 con la hipertensión se encuentran, como ya se ha comentado, los mediados por el sistema renina-angiotensina. En estudios llevados a cabo por nuestro grupo en ratas SHR, el losartán redujo la presión arterial y la expresión de COX-2, sugiriendo que el incremento en la expresión de COX-2 se debía a la mayor activación del sistema renina-angiotensina y de su acción a través de los receptores AT-1 (Álvarez y col., 2007). Similares resultados se encontraron a nivel de la corteza renal (Jamies y col., 2008). Chandramohan y col. (2008) mostaron un incremento en la expresión de COX-2 y de los receptores AT-1 en riñón de ratas hipertensas sensibles a sal. Además, la activación de PLA_2 por angiotensina II podría ser otra vía diferente para incrementar la producción de prostanoides independiente de la inducción de la expresión de COX-2 (Freeman y col., 1998). El aumento en los niveles de citoquinas circulantes (Sheares y col., 2004; Vila y Salaices, 2004; Savoia y Schiffrin, 2006) y la mayor activación tanto de factores de transcripción proinflamatorios (Beswick y col 2001b; Kim y Iwao; 2003; Sanz-Rosa y col, 2005a) como de las MAPK p38, ERKs 1/2 y JNK (Izumi y col., 2000; Touyz y col., 2001a; 2001b; Kwon y col., 2004) que ocurren en la hipertensión, sugieren que estas alteraciones podrían participar en el incremento en la expresión de COX-2 observado en esta patología.

Como se comentó previamente, el aumento en el estrés oxidativo asociado a la hipertensión arterial (Rajagopalan y col., 1995; Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001a; 2001b; Zhou y col., 2003; Redón y col., 2003; Touyz, 2004; Delano y col., 2005; Chaves y col., 2007) podría contribuir al incremento de la expresión de COX-2 asociado a esta patología. Así, se ha descrito que el tratamiento con antioxidantes reduce la expresión de COX-2 en la corteza renal de ratas diabéticas (Li y col., 2005), y que el estrés oxidativo contribuye a la inducción de COX-2 en células mesangiales estimuladas con Il-1β, LPS y TNFα (Feng y col., 1995). De ese modo, el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre la expresión de COX-2 en distintos modelos de hipertensión puede ser ejercido a través de su capacidad para incrementar el grado de activación tanto de factores de transcripción redox sensibles como NFκB o AP-1, como de rutas de señalización dependientes de JNK, p38MAPK y ERK1/2 (Beswick y col., 2001b; Lu y col., 2005; Collino y col., 2006), las cuales, como se mencionó previamente, son importantes reguladoras de la expresión de COX-2 (LaPointe e Isenovic, 1999; Zhang y col., 2000; Nieminen y col., 2005; Beltrán y col., 2009).

4. PPARs

Los receptores activadores de la proliferación peroxisomal o PPARs son factores de transcripción activados por ligando pertenecientes a la superfamilia de los receptores nucleares (Desvergne y Wahli, 1999). El término PPAR deriva de los trabajos efectuados por Issemann y Green en 1990, los cuales observaron como un grupo de hepatocarcinógenos con actividad hipolipemiante eran capaces tanto de activar la proliferación como de aumentar el tamaño de los peroxisomas en roedores. Este efecto resultó mediado a través de la activación de la isoforma alfa, primera isoforma de PPAR en ser caracterizada. Hasta la fecha se han identificado y clonado 3 isoformas diferentes de PPAR con distintos patrones de expresión tisular: PPARα (NR1C1), PPARβ/δ (NR1C2 o NUC-1) y PPARγ (NR1C3). Estas tres isoformas comparten entre un 60 y un 80 % de homología en sus dominios de unión a ligando (Kliewer y col., 1994; Braissant y col., 1996; Desvergne y Wahli, 1999). Los PPARs están estructurados en dominios funcionales. En el extremo amino terminal se encuentra el dominio regulador de la actividad del receptor (dominio A/B), seguido del dominio de unión al ADN que reconoce secuencias específicas para PPAR en los genes diana, y un dominio para el reclutamiento de cofactores. En su extremo carboxilo terminal se sitúa el dominio de unión al ligando (Tugwood y col., 1992; Gurnell y col., 2003; Schiffrin, 2005) (Fig. 12).

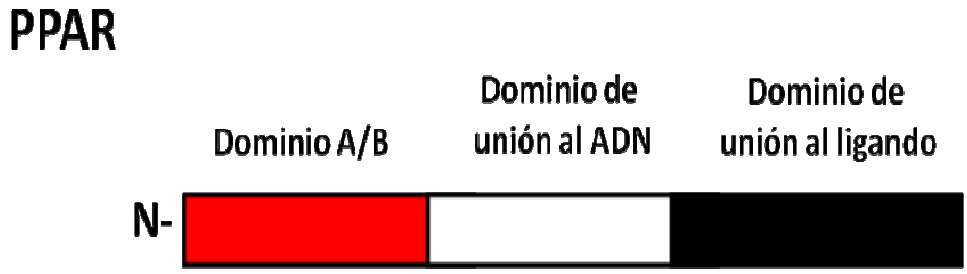


Fig. 12: Esquema mostrando la estructura proteica tipo de los PPAR.

4.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RECEPTORES PPAR

La regulación de la expresión génica por los receptores PPAR se puede llevar a cabo bien por mecanismos de activación o por mecanismos de represión, los cuales se detallan a continuación.

4.1.1. Activación de la expresión génica

La implicación de los PPARs en la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis de glucosa se debe a la activación transcripcional de genes en tejidos clave para estos procesos, como son el tejido adiposo, el músculo esquelético o el hígado (Tugwood y col., 1992; Desvergne y Wahli, 1999; Gurnell y col., 2003).

En un modelo de activación clásico, en presencia de activadores específicos, los PPARs se encuentran como heterodímeros junto al receptor X del ácido retinoico (RXR) y unidos a los elementos de respuesta a PPAR (PPRE) en los promotores o regiones *enhancer* de los genes diana (Fig. 13).

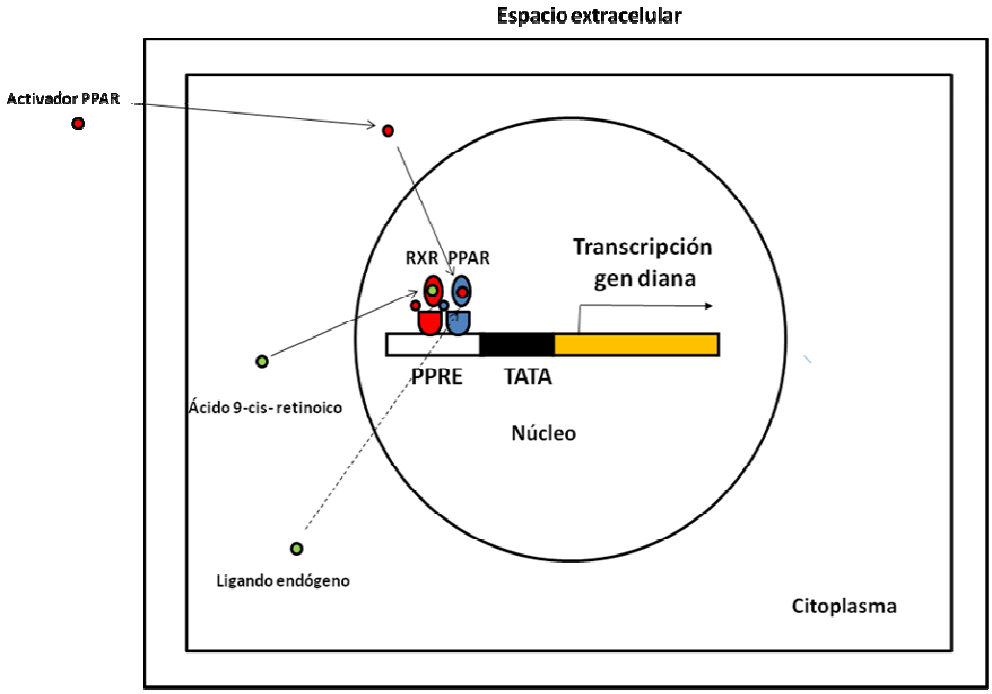


Fig. 13: Esquema que muestra el mecanismo clásico de activación transcripcional ejercido por los PPARs. El heterodímero PPARγ-RXR unido a secuencias PPRE, una vez activado por la unión del agonista PPAR, activa la transcripción génica. PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas, RXR: receptor X del ácido retinoico, PPRE: elemento de respuesta a PPAR.

Los PPREs consisten en una repetición directa de la secuencia hexamérica AGGTCA separada por uno (DR-1) o dos nucleótidos (DR-2) (Desvergne y Wahli, 1999; Gervois y col., 1999; Girnun y col., 2002). Una vez unidos a los PPRE, la activación transcripcional por unión del ligando promueve una modificación alostérica en el extremo carboxilo terminal que induce el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como p300/CBP (Gelman y col., 1999) o SRC-1 (Llopis y col., 1999).

4.1.2. Represión de la expresión génica

Los PPARs, 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. Este efecto de los PPARs es el responsable del papel que se les otorga en la regulación de la respuesta inflamatoria asociada a patologías cardiovasculares y desórdenes metabólicos como la hipertensión, la diabetes o la aterosclerosis. Aunque la actividad represora fundamental es llevada a cabo por mecanismos de transrepresión independientes de la unión a PPRE, los PPARs también pueden reprimir la expresión génica de forma independiente a la unión de sus activadores (Delerive y col., 1999a; 1999b; Ricote y Glass, 2007). A continuación se detallan los mecanismos por los cuales estos receptores nucleares reprimen la expresión génica.

4.1.2.1. Mecanismos de transrepresión

4.1.2.1.1. Secuestro de coactivadores

Tanto los PPARs como muchos factores de transcripción implicados en la respuesta inflamatoria y en el aumento del estrés oxidativo presentan en sus rutas de activación coactivadores comunes, cuyos niveles intracelulares suelen ser limitantes. Los PPARs son capaces de competir por el reclutamiento de estos coactivadores o reducir la activación de los mismos, inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios (Li y col., 2000b; Ricote y Glass, 2007) y, por lo tanto, reduciendo la respuesta inflamatoria (Fig. 14).

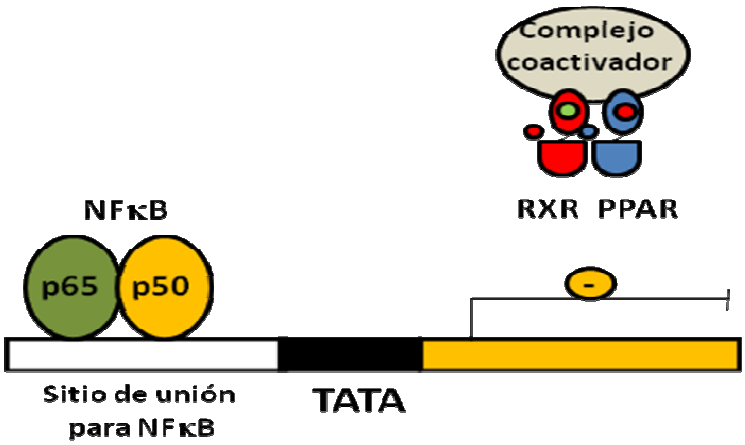


Fig. 14: Esquema que muestra como los PPARs ejercen transrepresión génica secuestrando coactivadores necesarios para la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria. NFκB: factor nuclear de la síntesis de la cadena ligera κ de linfocitos B, PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas, RXR: receptor X del ácido retinoico (adaptado de Ricote y Glass, 2007).

4.1.2.1.2. Represión génica por estabilización de complejos correpresores

Los PPARs son también capaces de bloquear la liberación de complejos correpresores como NCOR (*nuclear receptor binding correpresors*) o SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors)*, los cuales inhiben la activación de factores de transcripción proinflamatorios y funcionan como "freno" para la expresión activa de los genes bajo su control. En este sentido, la adición covalente de

grupos SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) a las histidinas de los PPARs les permite interaccionar con estos complejos correpresores estabilizando su unión a los factores de transcripción proinflamatorios y evitando, por lo tanto, la activación transcripcional de genes implicados en la respuesta inflamatoria (Pascual y col., 2005; Ricote y Glass, 2007) (Fig. 15).

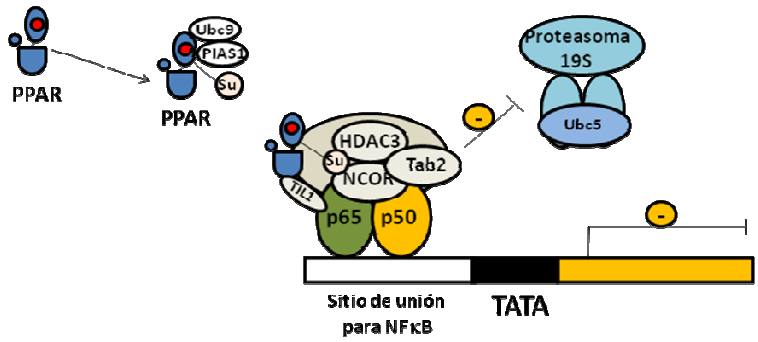


Fig. 15: Esquema que muestra como la *sumoilación* de histidinas de PPARs activados aumenta la afinidad de complejos correpresores como NCOR por factores de transcripción proinflamatorios como NFκB y, por lo tanto, bloquea la transcripción de genes implicados en la respuesta proinflamatoria. HDAC3: histona deacetilasa 3, NCOR: correpresor nuclear, PIAS1: proteína inhibidora de STAT activado 1, PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas, Su: Grupo Sumo, Tab2: proteína de unión a Tak 2, TIL 1: locus de integración de células T, Ubc9: enzima conjugadora de ubiquitina 9 (adaptado de Ricote y Glass, 2007).

4.1.2.1.3. Inhibición de rutas de señalización implicadas en la expresión de genes proinflamatorios

Los PPARs también son capaces de reprimir la expresión génica inhibiendo la activación de distintas quinasas implicadas en la respuesta inflamatoria como JNK, p38MAPK, ERKs (Desreumaux y col., 2001; Rodríguez-Calvo y col., 2008), Akt (Goetze y col., 2002) o PKC (Paumelle y col., 2006). Por otra parte, la activación de la expresión de IκBα (Delerive y col., 2000) o la inhibición de la expresión de IκK (Zingarelli y col., 2003), también contribuyen a reprimir la expresión génica inhibiendo la activación de NFκB y, por lo tanto, su translocación nuclear y la activación de la transcripción de sus genes diana (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 16).

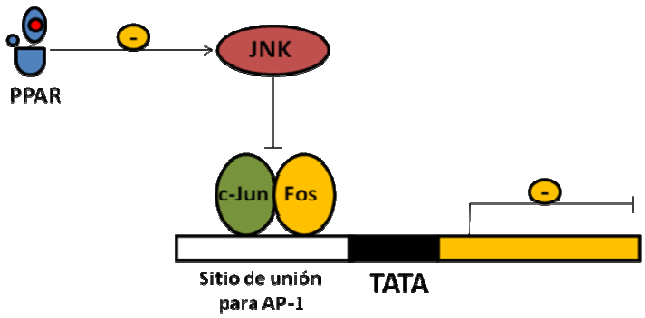


Fig. 16: Esquema que muestra como PPAR puede inhibir distintas quinasas implicadas en la activación de factores de transcripción proinflamatorios. Así, la activación de PPAR puede inhibir la MAPK JNK, inhibiendo la fosforilación de c-Jun y, por lo tanto, la activación del complejo AP-1, heterodímero esencial para la transcripción de multitud de genes proinflamatorios. AP-1: proteína activadora 1, JNK: quinasa del extremo N terminal de c-Jun, PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas (adaptado de Ricote y Glass, 2007).

4.1.2.1.4. Bloqueo de la activación de factores de transcripción por interacción física

Los PPARs pueden interaccionar físicamente con factores de transcripción como NFκB, AP-1 (Delerive y col., 1999a; 1999b; Chung y col., 2000) o NFAT (Yang y col., 2000), bloqueando su unión a las secuencias reguladoras de sus genes diana e inhibiendo la expresión de genes proinflamatorios dependientes de la activación de estos factores (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 17).

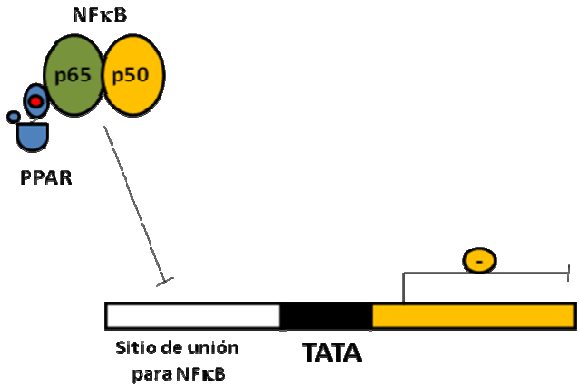


Fig. 17: Esquema que muestra como PPAR, interaccionando físicamente con factores de transcripción proinflamatorios como NFκB, reduce su capacidad de unión a los promotores de sus genes diana. NFκB: factor nuclear de la síntesis de la cadena ligera κ de linfocitos B, PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas (adaptado de Ricote y Glass, 2007).

4.1.2.2. Represión génica independiente de ligando

En ausencia de ligando, los PPARs pueden bloquear la activación transcripcional uniéndose a los PPRE de los genes diana y reclutando complejos correpresores como los ya mencionados NCOR (Hörlein y col., 1995) o SMRT (Chen y Evans, 1995), antagonizando así la unión de complejos coactivadores y manteniendo inactiva la expresión génica (Ricote y Glass, 2007) (Fig. 18).

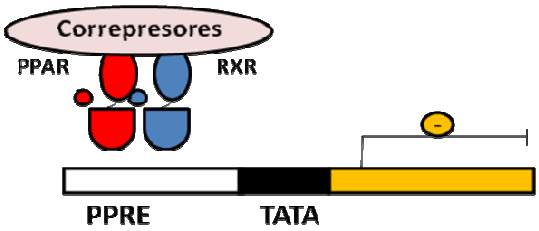


Fig. 18: Esquema que muestra como los PPARs ejercen represión génica en ausencia de ligando reclutando correpresores y, por lo tanto, bloqueando la unión de complejos coactivadores. PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas, PPRE: elemento de respuesta a PPAR, RXR: receptor X del ácido retinoico (adaptado de Ricote y Glass, 2007).

4.2. PPARγ

PPARγ se expresa principalmente en el tejido adiposo blanco, aunque su expresión es detectable en una gran cantidad de tejidos como glándulas adrenales, médula, corazón, colon o linfocitos T (Braissant y col., 1996; Vidal-Puig y col., 1997; Marx y col., 2004; Touyz y Schiffrin, 2006). Además, todos los tipos

celulares de la pared vascular, incluyendo monocitos y macrófagos infiltrados (Bouhlel y col., 2008), células endoteliales (Satoh y col., 1999), CMLV (Law y col., 2000; Diep y Schiffrin, 2001) y fibroblastos adventiciales (Zhang y col., 2008) expresan en mayor o menor medida PPARγ, siendo sus niveles de expresión variables según el lecho vascular e incluso el estadío del ciclo celular en el que se encuentren. Existen dos isoformas de PPARγ descritas, $PPAR\gamma_1$ y $PPAR\gamma_2$, ambas codificadas por el mismo gen pero expresadas a partir de distintos promotores y de *splicing* alternativo, diferenciándose sólo en 30 aminoácidos de su extremo amino terminal (Fajas y col., 1997) (Fig. 19).

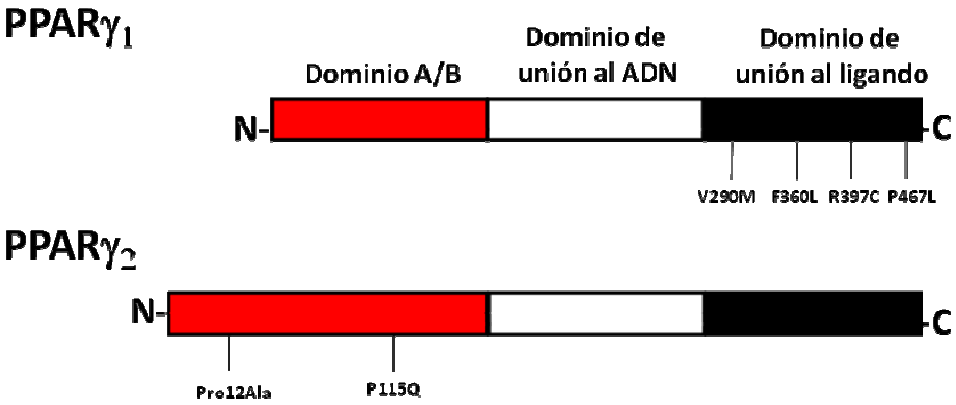


Fig. 19: Esquema mostrando la estructura proteica de las dos isoformas de PPARγ. Distintas mutaciones con relevancia patológica (V290M, F360L, R397C, P467L y P115Q) se muestran ubicadas en el esquema, al igual que el polimorfismo Pro12Ala (adaptado de Gurnell y col., 2003).

La expresión de ambas isoformas es tejido-dependiente, de manera que $PPAR\gamma_2$ se expresa principalmente en tejido adiposo mientras que $PPAR\gamma_1$, además de expresarse en los adipocitos, se expresa a bajos niveles en muchos tipos celulares, incluyendo los componentes de la pared vascular. En tejido adiposo y colon se ha descrito la presencia de un tercer tipo de ARNm de PPARγ; sin embargo, su traducción produce una proteína indistinguible de $PPAR\gamma_1$ (Fajas y col., 1998; Desvergne y Wahli, 1999).

El modelo cristalográfico propuesto por Nolte y col. (1998) sugiere que, aunque la activación de PPARγ se puede llevar a cabo por un amplio grupo de ligandos, sólo algunos con un núcleo químico estructural común ejercen activaciones eficaces, estableciendo puentes de hidrógeno entre los grupos acídicos de los ligandos con los residuos Y73, H49 y H323 de la región de reconocimiento del receptor. Dentro del grupo de ligandos capaces de activar PPARγ encontramos ligandos endógenos como los ácidos grasos poliinsaturados, derivados de COX-2 como la15 d-PGJ_2 (15-deoxi-delta-12,14-prostaglandina J_2) y componentes de las LDL oxidadas como el 9- y 13-HODE (Forman y col., 1995; Kliewer y col., 1995; Nagy y col., 1998). Existen además ligandos sintéticos como los fármacos pertenecientes a la familia de las tiazolidinedionas (TZDs) que se comportan como agonistas sintéticos con alta afinidad por los receptores PPARγ (Lehmann y col., 1995; Willson y col., 1996; Staels y Fruchart, 2005). El primer fármaco de esta familia que se introdujo fue la troglitazona, la cual acabó desechándose debido a su tendencia a provocar toxicidad hepática (Watkins y col., 1998). Estudios posteriores demostraron que este efecto adverso no se puede considerar un efecto de clase (Yamamoto y col., 2001). Sin embargo, se han descrito efectos secundarios asociados al tratamiento con TZDs como son el aumento de peso, la generación de edemas, el aumento en la retención de líquidos, en la concentración de lipoproteinas e incluso el riesgo de hipertrofia

ventricular, lo que hace que su uso no sea recomendado en pacientes con afectación cardiaca severa (Nesto y col., 2001). Las TZDs más utilizadas son la rosiglitazona y la pioglitazona, las cuales resultan eficaces en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus de tipo II y/o obesos (Estudio PROactive, 2005; Estudio DREAM, 2006; Erdmann y col., 2007; Chiarelli y DiMarzio, 2008), con hipercolesterolemia (Tao y col., 2003) o con dislipidemia (Hansen y Connolly, 2008). Estos fármacos reducen la resistencia periférica a insulina, los niveles de glucosa circulantes, los niveles de citoquinas proinflamatorias y las frecuentes complicaciones cardiovasculares asociadas a todas estas patologías. Además, estudios llevados a cabo en distintos modelos animales de hipertensión como el de ratas sensibles a sal (Bolten y col., 2007) o el de ratas "DOCA-*salt*" (Iglarz y col., 2003) sugieren que las TZDs pueden tener efectos beneficiosos en el tratamiento de esta patología debido a sus efectos hipotensores y su capacidad para reducir el remodelado vascular y mejorar la disfunción endotelial asociada a esta patología.

4.2.1. Efectos antiinflamatorios

Cada vez existen más evidencias de que PPARγ desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria, ya que su activación reduce la expresión de distintas citoquinas y enzimas proinflamatorias en distintos tipos celulares incluyendo macrófagos, CMLV, células endoteliales, células dendríticas y linfocitos (Marx y col, 2004; Touyz y Schiffrin, 2006; Szeles y col., 2007; Bouhlel y col., 2008). Así, la activación de PPARγ reduce la producción de VCAM-1, ICAM-1 (Klotz y col., 2007) y endotelina-1 (Delerive y col., 1999b) en células endoteliales y de MMP-9 e iNOS (Marx y col., 1998; Ikeda y col., 2000) en CMLV. Además, su capacidad para regular directamente la respuesta del sistema inmune es clave en la actividad antiinflamatoria de PPARγ. Así, la activación de PPARγ regula la proliferación y activación inmune de los linfocitos T, inhibiendo la producción de IL-2, TNFα e INFγ (Clark y col., 2000; Marx y col., 2002), además de reducir la producción de TNFα, IL-6 e IL-1β en monocitos circulantes (Jiang y col., 1998), la expresión de MMP-9, iNOS, IL-12 y osteopontina en macrófagos (Ricote y col., 1999; Welch y col., 2002; Oyama y col., 2002), los niveles de IL-12 en células dendríticas (Faveeuw y col., 2000) y de MCP-1 en células epiteliales (Momoi y col., 2001). Además, en relación con esto, la acción antiinflamatoria de PPARγ sobre células de la pared vascular también tiene relevancia en la regulación del sistema inmune, ya que como Marx y col. (2000) observaron en células endoteliales humanas, la activación de PPARγ inhibe la producción de moléculas clave para la activación de los linfocitos T como CXC, IP-10, Mig e I-TAC, cuya expresión es inducida por INF-γ.

El hecho de que PPARγ pueda activarse por productos derivados de COX-2 como la 15d-PGJ_2 (Kliewer y col., 1995; García-Bueno y col., 2008) y que niveles elevados de citoquinas regulan la expresión de PPARγ, son datos que avalan la hipótesis de su participación en la regulación de la respuesta inflamatoria. Así, IL-4 induce la expresión del receptor (Huang y col., 1999), mientras que la incubación con LPS la reduce (Barish y col., 2005), sugiriendo que en el primer caso, la citoquina podría estar incrementando los mecanismos antiinflamatorios con carácter protector y en el segundo, que la reducción de la expresión de PPARγ por el agente patógeno contribuiría a activar la respuesta inflamatoria. Por otro lado, los trabajos llevados a cabo por Fu y col. (2001; 2002; 2003) relacionan la inducción de la expresión de PPARγ por distintas citoquinas y mediadores proinflamatorios con la activación y el incremento en la expresión del factor de transcripción de genes de respuesta temprana Egr-1. Puesto que Egr-1 se activa ante el estrés

oxidativo (Wang y col., 2006b), uno de los principales implicados en la respuesta inflamatoria, el incremento en la expresión de PPARγ mediada por Egr-1 podría estar activando mecanismos antioxidantes formando un bucle de regulación negativa, que contribuiría a reducir la expresión de genes proinflamatorios evitando la inducción perpetua de los mismos.

Uno de los efectos antiinflamatorios más relevantes de PPARγ a nivel vascular es ejercido sobre el sistema renina-angiotensina. Tham y col. (2002) describieron la relación entre la reducción de la expresión de PPARγ y el incremento en la actividad del RAS como una de las causas responsables de las alteraciones vasculares ejercidas por la angiotensina II. Además, Alexis y col. (2009) han demostrado recientemente que la activación de la quinasa Bcr por angiotensina II regula negativamente la actividad de PPARγ a nivel postraduccional. Reforzando la hipótesis del antagonismo entre el RAS y PPARγ está el hecho de que metabolitos del losartán y otros antagonistas de los receptores AT-1 son activadores de PPARγ (Schupp y col., 2006; Erbe y col., 2006; Storka y col., 2008). De igual manera, también está documentada la reducción en las alteraciones vasculares inducidas por angiotensina II tras la activación de PPARγ. Así, el tratamiento tanto con pioglitazona como rosiglitazona redujo la hiperproliferación celular, la expresión de receptores AT-1, de marcadores de inflamación vascular como VCAM-1 y la actividad de NFκB inducida por el tratamiento "*in vivo"* con angiotensina II (Diep y col., 2002a). La activación de PPARγ reduce también la migración celular, la expresión y la actividad de la MMP-9 y los cambios estructurales, funcionales y moleculares ejercidos por la angiotensina II (Diep y col., 2002a). Por su parte, Benkirane y col. (2006a; 2006b) observaron en CMLV y en aorta que el tratamiento con rosiglitazona inhibía el crecimiento celular inducido por angiotensina II y, por lo tanto, revertía el remodelado vascular inducido por este péptido, reduciendo la activación de ERK 1/2 y Akt. De acuerdo con las propiedades antiinflamatorias de PPARγ, De Ciuceis y col. (2007) observaron que el tratamiento con rosiglitazona de ratas perfundidas con angiotensina II, además de reducir la activación de NFκB y la expresión de VCAM-1 inducida por este péptido, reducía el estrés oxidativo inhibiendo la actividad de la NAD(P)Hox vascular de forma dosis dependiente. Esto indica que el efecto antagónico de la activación de PPARγ sobre los efectos de la angiotensina II puede ser de gran relevancia en el tratamiento de la hipertensión debido a su capacidad para inhibir el remodelado vascular, la expresión de marcadores inflamatorios o, como más adelante se detallará, el aumento en la producción de prostanoides contráctiles derivados de COX-2. Por otro lado, datos recientes permiten relacionar la actividad antiinflamatoria ejercida por las estatinas con la activación de PPARγ, ya que se ha visto que simvastatina reduce la expresión de CCR2 (receptor de quimiocinas 2) a través de mecanismos dependientes de PPRE, incrementándose la expresión de CCR2 tras el tratamiento con el antagonista de PPARγ GW9662 (Han y col., 2005b). Este dato fue corroborado por Yano y col. (2007), los cuales inhibiendo la expresión de PPARγ por ARN interferente o por antagonistas específicos, observaron que el efecto de las estatinas sobre la transcripción de TNFα y MCP-1 se reducía. Puesto que las estatinas inhiben además de la expresión de COX-2, una gran cantidad de citoquinas proinflamatorias (Deng y col., 2006), el efecto antiinflamatorio vascular del que son responsables podría ser mediado a través de PPARγ.

La mayoría de los efectos antiinflamatorios y antioxidantes asociados a PPARγ se llevan a cabo a nivel transcripcional a través de la activación de mecanismos de transrepresión que antagonizan a distintos niveles la activación de factores de transcripción como AP-1, C/EBP, STAT-1 o NFκB (Ricote y Glass,

2007). Existen una gran cantidad de estudios que muestran que la activación de PPARγ reduce la activación de NFκB. Así, por ejemplo, Liu y col. (2005) observaron que la inflamación pulmonar inducida por inyección intravenosa de LPS en ratas requiere de la activación de NFκB y como el tratamiento con rosiglitazona reduce esta activación junto con los niveles circulantes de TNFα, ICAM-1 y mieloperoxidasa; confirmando la relación entre la expresión de PPARγ y su capacidad antiinflamatoria, este efecto fue acompañado por un incremento en la expresión del propio receptor nuclear (Liu y col., 2005). Similares resultados se obtuvieron en células endoteliales donde la activación de PPARγ redujo la expresión de marcadores inflamatorios como iNOS (Ikeda y col., 2000), VCAM-1 (Diep y col., 2002a) e ICAM-1 (Pasceri y col., 2000) o de mediadores proinflamatorios y vasoactivos como MCP-1 (Momoi y col., 2001) o endotelina-1 (Satoh y col., 1999; Iglarz y col., 2003), todos ellos dependientes de la activación de NFκB y/o AP-1 (Wung y col., 1997; Jiang y col., 2004b; Aktan, 2004; Hong y col., 2004).

La interferencia en la ruta de activación de NFκB por PPARγ puede tener lugar a distintos niveles. Chung y col. (2000) demostraron que PPARγ podía inhibir la expresión de genes dependientes de NFκB interactuando físicamente tanto con la subunidad p65 como con la subunidad p50 de este factor de transcripción y, por lo tanto, bloqueando su activación. Zingarelli y col. (2003) demostraron que la inhibición de la ruta de NFκB por PPARγ también se podía llevar a cabo mediante la inhibición de la actividad de IκK y el aumento consiguiente en los niveles de IκBα. Delerive y col. (1999b) observaron que PPARγ, además de antagonizar la ruta de NFκB, interacciona físicamente con c-Jun e inhibe la activación del complejo AP-1 y la activación transcripcional del promotor de endotelina-1. Adicionalmente, la reducción de la activación del complejo AP-1 por PPARγ también puede ser resultado de la inhibición de la JNK (Khandoudi y col., 2002). 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 (Pascual y col., 2005).

La disfunción endotelial es una característica de patologías como la hipertensión, la aterosclerosis y la diabetes y se asocia a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001a; 2001b). El tratamiento con activadores de PPARγ mejora esta disfunción endotelial probablemente debido a sus acciones antioxidantes. Así, la activación de PPARγ inhibe la producción de ROS de forma paralela a la reducción en la expresión de las distintas subunidades de la NADP(H) oxidasa, lo que aumenta la biodisponibilidad de NO generado por la eNOS y, por lo tanto, mejora la vasodilatación dependiente de endotelio (Hwang y col., 2005; 2007; Sorrentino y col., 2007). El efecto antioxidante de PPARγ, junto a la observación de que la inducción de COX-2 es mediada por especies reactivas de oxígeno (Peng y col., 2005), y que, como se comentará a continuación, la activación de PPARγ regula negativamente la expresión de esta enzima (Zhao y col., 2006), sugiere que este efecto podría llevarse a cabo a través de la reducción del estrés oxidativo.

4.2.1.1. Relación entre la activación de PPARγ y la expresión de COX-2

Como se ha comentado, la regulación de la expresión de COX-2 a nivel vascular requiere de la activación, entre otros, de los factores de transcripción NFκB y AP-1 (Chun y Suhr, 2004; Simmons y col., 2004; Tsatsanis y col., 2006). El hecho de que la activación de PPARγ sea capaz de bloquear la activación de NFκB sugiere que este receptor nuclear podría regular la expresión de COX-2 a este nivel. En este sentido, Sánchez-Hidalgo y col. (2007) observaron en un modelo murino de inflamación inducido por ácido sulfónico que, efectivamente, la reducción en la activación de NFκB asociada a la activación de PPARγ redujo la expresión de COX-2. Similares resultados obtuvieron Simonin y col. (2002) en fibroblastos sinoviales tratados con LPS en presencia de 15d-PGJ_2, y Subbaramaiah y col. (2001) en células epiteliales estimuladas con PMA (12-miristato 13-acetato forbol) y tratadas con ciglitazona, troglitazona y 15d-PGJ_2, donde la activación de PPARγ inhibió la expresión de COX-2 de forma paralela a la reducción en la activación de NFκB y AP-1. Además, confirmando la especificidad de la inhibición de la expresión de COX-2 mediada por PPARγ, Méndez y LaPointe (2003) comprobaron que el incremento en la expresión de COX-2 en cardiomiocitos estimulados con IL-1β se reducía en presencia de 15-dPGJ_2 y troglitazona, y que además, este efecto se revertía tras el tratamiento con el antagonista de PPARγ GW9662.

Reforzando la relación antagónica entre la activación de PPARγ y la actividad de COX-2, Sugawara y col. (2001a; 2001b) demostraron que la inhibición de la síntesis de prostanoides por PPARγ se lleva a cabo además de por la inhibición COX-2, por la reducción en la expresión de otras enzimas implicadas en la síntesis de prostanoides proinflamatorios, ya que en CMLV la activación de este receptor nuclear suprimía tanto la transcripción de la TXA_2 sintasa como la de los receptores TP. Apuntando en el mismo sentido, la relación inversa entre los niveles de expresión de PPARγ y los de COX-2 es un hecho confirmado, ya que la sobreexpresión de PPARγ reduce la expresión de COX-2 (Bren-Mattison y col., 2008). La inhibición de p38MAPK y de ERK 1/2 es otro mecanismo por el cual PPARγ podría llevar a cabo la reducción en la expresión de esta enzima proinflamatoria (Goetze y col., 1999; Desreumaux y col., 2001).

A pesar de que la capacidad de PPARγ para inhibir la expresión de COX-2 está ampliamente descrita, también existen estudios que postulan su participación en la inducción de esta enzima. La existencia de un elemento de respuesta a PPAR (PPRE) en el extremo 5´ del promotor de COX-2 (Meade y col., 1999; Pontsler y col., 2002), junto con la observación de la inducción de la expresión de COX-2 y PLA_2 y el aumento de los niveles de PGD_2 y PGE_2 en CMLV tratadas con rosiglitazona, sugirieron en un principio una relación positiva entre la expresión de COX-2 y la de PPARγ (Bishop-Bailey y Warner, 2003). Sin embargo, en contra de los datos referentes a la contribución de PPARγ en la inducción de COX-2, está el hecho de que el ligando endógeno de PPARγ la 15-dPGJ_2 es un producto derivado de COX-2, con lo que cabe la posibilidad de que el propio aumento en la actividad de COX-2 y, por lo tanto, el incremento en sus productos, contribuya a reducir la expresión de COX-2 a modo de bucle de regulación negativa para evitar la síntesis de prostanoides proinflamatorios "*ad eternum*". En cualquier caso, el hecho de que la 15-dPGJ_2 pueda unirse covalentemente a PPARγ interfiriendo en su activación (Soares y col., 1995) sugiere que se requieren estudios más en profundidad para confirmar esta hipótesis.

4.2.1.2. Relevancia de PPARγ en el desarrollo de patologías cardiovasculares

Además de sus efectos antiinflamatorios y metabólicos, la activación de PPARγ reduce la presión arterial en distintos modelos de hipertensión. Así, Iglarz y col. (2003) en ratas "DOCA-*Salt*" observaron que el tratamiento con rosiglitazona reducía la presión arterial y la disfunción endotelial característica de este modelo de hipertensión. Ryan y col. (2004) observaron en ratones transgénicos para el gen de la renina y la angiotensina que la inhibición del sistema renina-angiotensina mediada a través de la activación de PPARγ seguía manteniéndose a nivel funcional, ya que en este modelo de hipertensión el tratamiento con rosiglitazona tuvo un notable efecto hipotensor. Por otra parte, el hecho de que la activación de PPARγ bloquee la actividad de los canales de calcio en CMLV indica que este receptor nuclear podría ejercer un efecto directo sobre la presión arterial independiente de su mejora en los parámetros metabólicos (Buchanan y col., 1995; Nakamura y col., 1998). Además, la mejora en la disfunción endotelial con los activadores de PPARγ previamente comentada parece estar también relacionada con un aumento en los niveles de NO, ya que la sobreexpresión de PPARγ en células endoteliales incrementa aún más los niveles de este mediador (Calnek y col., 2003). El incremento en la producción de NO observado tras la activación de PPARγ podría llevarse a cabo por mecanismos que implican tanto un incremento en la actividad de la eNOS (Polikandriotis y col., 2005) como un aumento en la biodisponibilidad del NO debido a la inhibición de la expresión de distintas subunidades de la NAD(P)Hox y, por lo tanto, de la producción de ROS (Hwang y col., 2005; 2007; Sorrentino y col., 2007). Además, la mejora en la disfunción endotelial observada al activar PPARγ también podría estar relacionada con la modulación de procesos angiogénicos. En este sentido, Xin y col. (1999) han demostrado que la activación de PPARγ inhibe la expresión de VEGF-1 y 2, reduciendo la formación del tubo endotelial "*in vitro*". Estos resultados, junto con los obtenidos por Goetze y col. (2002) que mostraban que la migración de células endoteliales inducida por VEGF se veía reducida, y la observación de que la activación de PPARγ activaba la diferenciación de APCs (células progenitoras de la médula ósea marrón) a células endoteliales (Wang y col., 2004), son pruebas de ello. Puesto que las características que mejor definen la patología hipertensiva son el incremento en la resistencia vascular periférica y la disfunción endotelial, entre otras, el hecho de que la activación de PPARγ pudiese contribuir a corregir dichas alteraciones aporta nuevos argumentos para continuar investigando si la activación de este receptor nuclear puede ser una diana terapeútica efectiva en su tratamiento.

A pesar de que los efectos funcionales de la activación de PPARγ están bien descritos, la existencia de alteraciones en los niveles de expresión de PPARγ en la hipertensión es un tema aún bastante controvertido. Tanto en arterias de conductancia como en arterias de resistencia procedentes de ratas SHR se ha descrito una menor expresión vascular de PPARγ, lo que justificaría el incremento en la proliferación, migración, inflamación y fibrosis asociado a este modelo de hipertensión (Wu y col., 2004). Similares resultados obtuvieron Ameshima y col. (2003) en un modelo de hipertensión pulmonar. Sin embargo, el análisis de la expresión de PPARγ llevado a cabo en cultivos de CMLV revela que ésta es mayor en cultivos procedentes de animales hipertensos, sugiriendo que el incremento en la expresión de PPARγ podría ser un mecanismo de compensación activado en respuesta tanto al aumento en la proliferación celular como al estado inflamatorio vascular (Diep y col., 2001). Por su parte, Xiong y col. (2005), también en cultivos de CMLV, observaron que los niveles de ARNm de PPARγ eran superiores en ratas SHR, pero sin embargo los de

proteína eran inferiores, sugiriendo una alteración en los mecanismos de regulación postranscripcional de la expresión de este receptor asociados a la hipertensión.

Además de la hipertensión, la diabetes, la aterosclerosis y la obesidad son también enfermedades inflamatorias crónicas en las que PPARγ juega un papel importante. Así, se ha descrito que la activación de PPARγ reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y otras moléculas implicadas en patologías como la diabetes tipo II o la obesidad, entre las que podemos encontrar el TNFα, IL-6 (Hammarstedt y col., 2005a; 2005b), leptina (Kallen y Lazar, 1996) y resistina (Samaha y col., 2006) e incrementa los niveles de adiponectina (Yu y col., 2002). En estudios llevados a cabo "*in vivo"* en pacientes con diabetes de tipo II, el tratamiento con TZDs redujo los niveles séricos de CRP (proteína C reactiva), MMP-9 (Haffner y col., 2002), TNFα (Miyazaki y col., 2007) y CD-40L (Varo y col., 2003) de forma íntimamente asociada a la reducción en el riesgo de accidente cardiovascular.

A pesar de los efectos secundarios asociados al uso de las TZDs, existen estudios que relacionan la activación de PPARγ por estos ligandos con una reducción en la severidad de patologías cardiacas. Así, en pacientes con afectación coronaria pero sin patología diabética, el tratamiento con rosiglitazona redujo la expresión de marcadores de activación endotelial como la E-selectina, CRP, fibrinógeno o el factor de von Willebrand, al igual que el grosor de la capa media o la actividad plaquetaria (Sidhu y col., 2003; 2004a; 2004b).

4.2.2. Efectos sobre proliferación, migración y diferenciación

A los mencionados efectos antiinflamatorios, antioxidantes y vasodilatadores ejercidos por PPARγ hay que añadir su capacidad para regular el ciclo celular, la proliferación, migración y apoptosis. La activación de PPARγ inhibe la expresión de MCMs (*Minichromosome maintenance protein*) necesarias para la replicación del ADN (Bruemmer y col., 2003a), reduce la fosforilación de la proteína de retinoblastoma y la expresión de ciclinas (Wakino y col., 2000), aumenta la expresión de p21 (Wakino y col., 2001), inhibe la actividad de la telomerasa (Ogawa y col., 2006) y reduce la síntesis de ADN inducidas por bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) o PDGF (Law y col., 2000). Por su parte, Benson y col. (2000) demostraron que las TZDs reducen la expresión de c-fos, reduciendo, por tanto, la actividad de AP-1, factor implicado en la regulación del ciclo celular además de en la respuesta inflamatoria. Este dato, junto con el obtenido por Goetze y col. (1999) donde la activación de PPARγ bloquea la activación de ERK 1/2 y la síntesis de ADN inducida por angiotensina II en CMLV, aporta más evidencias a su implicación en la regulación del ciclo celular. A los efectos antiproliferativos ejercidos directamente, hay que añadir el hecho de que la activación de PPARγ induce la expresión de GADD45 (Bruemmer y col., 2003), TGF-β (Redondo y col., 2005) e IRF-1 (Lin y col., 2004), factores todos ellos implicados en la activación de mecanismos de apoptosis.

Debido a que patologías caracterizadas por la existencia de remodelado cardiovascular como la hipertensión o la aterosclerosis presentan CMLV con un fenotipo hiperproliferativo (Fukuda, 1997), la capacidad de PPARγ para inhibir el crecimiento celular y fomentar el pase a un fenotipo diferenciado refuerza la importancia a nivel cardiovascular de este receptor nuclear. En relación con esto, Abe y col. (2003) observaron tras el tratamiento con 15d-PGJ_2 un aumento en la expresión de la cadena pesada de la

miosina y de la α-actina, dos marcadores de diferenciación de CMLV. Trabajos realizados en roedores demuestran que las TZDs también son efectivas en el tratamiento de alteraciones estructurales a nivel cardiaco. Así, la activación de PPARγ inhibe la hipertrofia de cardiomiocitos (Asakawa y col., 2002) y el remodelado del ventrículo izquierdo (Shiomi y col., 2002), además de reducir la deposición de colágeno y mejorar la dilatación ventricular en ratas prediabéticas (Tsuji y col., 2001).

Por otra parte, el efecto antiproliferativo y proapoptótico asociado a la actividad de PPARγ junto con el aumento en la expresión de este receptor en una gran cantidad de tipos de cáncer, hace que PPARγ sea una diana a considerar en el tratamiento de enfermedades de naturaleza oncogénica (Panigragy y col., 2005; Weng y col., 2006; Jarrar y col., 2007).

4.2.3. Efectos metabólicos

La activación de PPARγ es un evento clave en la diferenciación del adipocito, como se concluye del trabajo llevado a cabo por Gurnell y col. (2000) donde ésta se bloqueaba tras transfectar con un mutante dominante negativo de PPARγ. Además, Kubota y col. (1999) demostraron que la activación de PPARγ también era responsable de un cambio en la morfología en adipocitos maduros, reduciéndose en tamaño pero aumentando en sensibilidad a insulina, lo que resulta fundamental en patologías como la diabetes mellitus. La activación de PPARγ también es importante en la funcionalidad del adipocito, ya que incrementa la expresión de la lipoproteín lipasa (LPL) y de los transportadores de ácidos grasos con el objetivo de incrementar la lipólisis de triglicéridos plasmáticos, la absorción de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos en el interior del adipocito, estimulando el almacenamiento en el mismo y, por lo tanto, la reducción de los ácidos grasos circulantes (Way y col., 2001; Chinetti-Gbaguidi y col., 2005; Staels y col., 2005). Por otro lado, y como hecho de máxima relevancia en patologías como la aterosclerosis o la diabetes mellitus tipo II, la activación de PPARγ regula los niveles de colesterol incrementando los niveles del receptor de HDL CLA-1/ SRB-1 (Chinetti y col., 2000), ABCA1 (Chawla y col., 2001), ABCG1 (Akiyama y col., 2002), y del receptor de apo B48 (Haraguchi y col., 2003). Además, la activación de PPARγ reduce la acumulación intracelular de ésteres de colesterol (Argmann y col., 2003) y la absorción de LDLs glicosiladas (Gbaguidi y col., 2002).

Junto con sus efectos sobre el metabolismo lipídico, una de las funciones más importantes que desempeña PPARγ es la de regular la homeostasis de glucosa, por lo que se considera una diana importante en el tratamiento de patologías asociadas a estados hiperglicémicos como la diabetes mellitus tipo II, el síndrome metabólico y la obesidad. De hecho, la activación de estos receptores reduce la resistencia periférica a insulina y los niveles plasmáticos de glucosa y de la propia insulina en hígado, músculo y tejido adiposo (Ginsberg y col., 2000; Way y col., 2001; Kramer y col., 2001; Jiang y col., 2002; Norris y col., 2003; Chinetti-Gbaguidi y col., 2005; Hammarsted y col., 2005). Por otra parte, individuos con mutaciones en el gen de PPARγ presentan una resistencia a insulina severa evidente incluso en estadios tempranos (Savage y col., 2003). Los efectos sobre la homeostasis glucídica se relacionan también con la capacidad de este receptor nuclear para inducir la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 en hígado y músculo esquelético, hecho observado en ratas Zucker tratadas con rosiglitazona (Kramer y col., 2001).

4.3. PPARα

PPARα se expresa considerablemente en tejidos donde el catabolismo lipídico es importante como el hígado, el riñón, el intestino, el tejido adiposo, el músculo o el corazón, modulando la expresión de enzimas relacionadas con la ω y β-oxidación, el transporte de ácidos grasos y el metabolismo de lipoproteínas (Desvergne y Wahli, 1999; Bishop-Bailey, 2000; Staels y Fruchart, 2005). PPARα, además de en macrófagos, monocitos y linfocitos T (Chinetti y col., 1998; Neve y col., 2001; Marx y col., 2002), se expresa en todos los tipos celulares presentes en la pared vascular incluso a mayores niveles que la isoforma γ, contribuyendo, al igual que ésta, a la regulación la respuesta inflamatoria cardiovascular (Staels y col., 1998a; Inoue y col., 1998; Marx y col., 1998). PPARα puede ser activado por ligandos endógenos como ácidos grasos, eicosanoides, DHA, EPA, productos de la lipólisis de lipoproteínas o fosfolípidos oxidados, así como por ligandos sintéticos pertenecientes a la familia de los fibratos (Forman y col., 1996), utilizados en el tratamiento de hiperlipidemias, donde además se ha demostrado que, al igual que PPARγ, reducen el riesgo de accidentes cardiovasculares asociados a desórdenes metabólicos (Staels y Fruchart, 2005; Gervois y col., 2007; Staels, 2007).

Debido a los efectos metabólicos favorables de la activación tanto de la isoforma γ como de la α, se han desarrollado activadores duales, como el muraglitazar, ragaglitazar, naveglitazar o el tesaglitazar, los cuales han resultado eficaces reduciendo la resistencia periférica a insulina, los niveles plasmáticos de glucosa e insulina (Tozzo y col., 2007), triglicéridos, ácidos grasos libres, apo B, apo CIII, LDL y VLDL, e incrementando la actividad hepática de la LPL y la carnitina palmitoil transferasa (Chakrabarti y col., 2003), equilibrando, por tanto, el metabolismo glucídico, lipídico y lipoproteíco en general. Sin embargo, la utilización de estos activadores permanece actualmente rodeada de una gran controversia debido a los efectos tóxicos y carcinógenicos descritos en modelos murinos y algunos han visto suspendido su desarrollo alcanzada la fase III (Cabré, 2004; Fievet y col., 2006; Waites y col., 2007).

4.3.1. Efectos antiinflamatorios

Además de sus múltiples efectos sobre el metabolismo glucídico y lipídico, al igual que la isoforma γ, PPARα presenta propiedades antiinflamatorias a varios niveles. La primera evidencia que apuntó a los PPARs como elementos clave de la respuesta inflamatoria fue la demostración de que el leucotrieno B_4, un eicosanoide proinflamatorio, se unía a PPARα y activaba la transcripción de genes implicados en la ω y β-oxidación (Devchand y col., 1996). Así, existen varios estudios que sugieren que PPARα contribuye a la regulación de la respuesta inflamatoria en el sistema cardiovascular. En este sentido, la activación de PPARα reduce la expresión de TNFα y la actividad de NFκB inducida por LPS (Takano y col., 2000), aumenta los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Maruyama y col., 2002), inhibiendo además los efectos proinflamatorios de la sobreactivación del sistema renina-angiotensina al reducir el incremento en la síntesis de colágeno y la expresión de endotelina-1, VCAM-1 e ICAM-1 en vasos de ratas perfundidas con angiotensina II (Diep y col., 2002b; Iglarz y col., 2003; Diep y col., 2004). Además, ratones deficientes para PPARα muestran una exagerada respuesta inflamatoria vascular inducida por LPS (Delerive y col., 1999a). En CMLV, células endoteliales y macrófagos, la activación de PPARα en presencia de distintos estímulos

reduce la producción de marcadores inflamatorios como COX-2 e IL-6 (Staels y col., 1998a), VCAM-1 (Rival y col., 2002), y endotelina-1 (Delerive y col., 1999b) y en pacientes con hiperlipoprotinemia IIb reduce los niveles plasmáticos de INFγ y TNFα (Madej y col., 1998). Asimismo, el tratamiento con fibratos reduce los niveles plasmáticos de IL-6, CRP, TNFα y fibrinógeno en pacientes con hiperlipidemia (Jonkers y col., 2002). Además, PPARα también puede actuar directamente sobre la producción de citoquinas por células del sistema inmune, ya que los agonistas de PPARα reducen la producción de MCP-1, IL-1β, TNFα, INFγ, IL-6, IL-2 e IL-12 en células de la microglia, esplenocitos y linfocitos T y la expresión de iNOS en macrófagos (Cunard y col., 2002a; 2002b; Marx y col., 2002; Xu y col., 2005; Paukkeri y col., 2007).

Los efectos antiinflamatorios descritos se deben a la capacidad de PPARα de antagonizar la ruta de activación de factores de transcripción proinflamatorios por mecanismos de transrepresión, entre los cuales, de modo similar a como lo hacía la isoforma γ, se encuentran NFκB y AP-1. Se ha descrito que PPARα puede interaccionar físicamente con p65, además de inducir la expresión de IκBα, en cultivos de CMLV, todo lo cual deriva en el bloqueo de la activación de NFκB (Delerive y col., 1999a; 2000). En el hígado, la activación de PPARα reduce la expresión de CRP inducida por IL-1β y la producción de fibrinógeno inducida por IL-6 debido a la reducción en los niveles de C/EBP y p50 en el primer caso (Kleeman y col., 2003), mientras que en el segundo lo hace compitiendo con C/EBP-β por el complejo coactivador GRIP/TIF-2 (Gervois y col., 2001). La inhibición de la ruta de activación de AP-1, por la interacción física de PPARα con c-jun, es otro de los mecanismos de transrepresión que explica la inhibición en la producción de IL-6 inducida por IL-1β (Delerive y col., 1999a) o en la expresión de endotelina-1 inducida por trombina en células endoteliales (Delerive y col., 1999b).

PPARα también es capaz de ejercer sus efectos antiinflamatorios interfiriendo en la ruta de activación de quinasas. Jones y col. (2003) observaron que, en ausencia de ligando, PPARα inhibe la fosforilación de p38MAPK bloqueando la activación del linfocito T. Además, al igual que ocurría en el caso de PPARγ, las estatinas pueden llevar a cabo sus efectos por mecanismos dependientes de PPARα, como se ha observado en macrófagos, donde la reducción de la respuesta inflamatoria a LPS por el tratamiento con simvastatina es dependiente del grado de fosforilación de PPARα (Paumelle y col., 2006).

Al igual que PPARγ, PPARα puede ejercer sus acciones antiinflamatorias a través de la reducción del estrés oxidativo. En ratas perfundidas con angiotensina II, la activación de PPARα redujo la presión arterial y disminuyó el remodelado vascular de arterias pequeñas de resistencia, mejorando la disfunción endotelial, debido a la inhibición de la producción de anión superóxido por la NAD(P)Hox (Diep y col., 2002). Además, PPARα también contribuye a la regulación del tono vascular, como indica el hecho de que tanto ligandos sintéticos como naturales, incluyendo el fenofibrato y EPA, aumentan la expresión y actividad de la eNOS y, por lo tanto, los niveles de NO (Omura y col., 2001; Goya y col., 2004) reduciendo, además, la producción del péptido vasoconstrictor endotelina-1 inducida por trombina (Delerive y col., 1999b) o por LDLs oxidadas (Martin-Nizard y col., 2002).

4.3.2. Efectos metabólicos

PPARα regula el metabolismo lipídico, de apoproteínas y lipoproteínas, lo que determina su actividad hipolipemiante. La activación de PPARα inhibe la síntesis de triglicéridos, reduce sus niveles plasmáticos y

la producción de VLDL, estimulando tanto la absorción como la síntesis de ácidos grasos en hepatocitos y, por lo tanto, aumentando su utilización hepática (Staels y col., 1998b; Vu-Dac y col., 2003). Por otro lado, la activación de PPARα modifica el patrón de distribución de las LDLs, haciendo que LDLs pequeñas y densas se transformen en partículas más grandes y con más afinidad por su receptor y estimulando, además, la producción hepática de apo I, apo II y HDL (Staels y col., 1998b). En relación con esto, el estudio DAIS (*Diabetes Atherosclerosis Intervention Study*) (2001) confirma la relación entre los efectos ejercidos por los activadores de PPARα sobre el metabolismo apolipoproteíco y el riesgo de insuficiencia cardiaca. En este estudio, el tratamiento con fenofibrato de pacientes con un buen control glicémico, pero con anomalías en el metabolismo de apolipoproteínas, redujo los niveles de colesterol total, HDL, LDL, y triglicéridos de forma paralela a una disminución en el riesgo de accidente coronario.

A nivel cardiovascular, la activación mediada por PPARα de la transcripción de genes implicados en el catabolismo lipídico tiene una gran relevancia debido a que los ácidos grasos son el combustible primordial usado por el corazón. Así, ratones deficientes para el gen de PPARα muestran una β-oxidación de ácidos grasos de cadena media o larga significativamente reducida (Brandt y col., 1998). El hecho de que la expresión de este receptor nuclear sea fundamental para la capacidad de los miocitos de transportar ácidos grasos a la mitocondria y metabolizarlos evitando su acumulación intracelular, junto con la observación de la reducida actividad de PPARα asociada a fenómenos de hipertrofia cardiaca (Watanabe y col., 2000; Barger y col., 2000), sugiere que alteraciones en sus niveles de expresión podrían contribuir al desarrollo de insuficiencia cardiaca.

4.4. PPARβ/δ

Al igual que las otras dos isoformas, los receptores PPARβ/δ se expresan en una gran cantidad de tipos celulares, incluyendo cardiomiocitos, células del músculo esquelético, adipocitos, macrófagos, monocitos y todos los componentes de la pared vascular (Kliewer y col., 1994; Braissant y col., 1996; Wang y col., 2003). A pesar de que tanto de sus mecanismos de actuación como los agonistas endógenos responsables de su activación requieren estudios más en profundidad, debido al creciente número de datos que avalan su implicación en la regulación del catabolismo lipídico y la respuesta inflamatoria, se ha puesto mucho énfasis en el desarrollo de agonistas sintéticos para PPARβ/δ. Así, en la actualidad, ya se han desarrollado varios de estos agonistas como el GW501516 (Pelton, 2006), el GW610742 (Casey y col., 2008), el L165041 (Liang y col., 2008) o el agonista parcial GW9371 (Shearer y col., 2008), con la esperanza de que su utilización revele más información sobre los mecanismos regulados por esta isoforma.

4.4.1. Efectos antiinflamatorios

A nivel cardiovascular, la activación de PPARβ/δ en macrófagos reduce la expresión de iNOS y COX-2 inducida por LPS (Welch y col., 2003), además de activar el represor transcripcional Bcl-6 en CMLV (Ravaux y col., 2007). Esta actividad antiinflamatoria de PPARβ/δ también se lleva a cabo por mecanismos de transrepresión como los ya mencionados para las otras dos isoformas. Así, en células endoteliales el activador de PPARβ/δ L165041 redujo la expresión de VCAM-1 y de MCP-1 inducida por citoquinas bloqueando la activación transcripcional ejercida por NFκB (Rival y col., 2003). Además, al igual que

PPARα y PPARγ, PPARβ/δ también es clave en la regulación de la inflamación asociada a la aterogénesis, ya que la activación de PPARβ/δ reduce el área de la lesión esclerótica de forma paralela a la reducción en la expresión vascular de MCP-1, ICAM-1 y TNFα (Graham y col., 2005). Sin embargo, PPARβ/δ tiene dos caras, ya que por un lado ejerce funciones antiinflamatorias como la reducción de la lesión aterosclerótica, el aumento en la expresión del transportador ABCA1 y la liberación de colesterol mediada por apo I (Oliver y col., 2001), pero por otro lado podría promover la lesión aterosclerótica al activar la absorción lipídica, inducir la expresión de CD36, SRA (receptor secuestrador de clase A), ADRP (proteína relacionada con la diferenciación del adipocito) y A/FABP (proteína de unión de ácidos grasos del adipocito) y promover el almacenamiento de VLDL, triglicéridos y colesterol en el interior del macrófago (Vosper y col., 2001; Chawla y col., 2003). De esa forma, aunque PPARβ/δ, al igual que las otras isoformas, también se asocia con la regulación negativa de la respuesta inflamatoria, aún se requiere profundizar mucho más en los mecanismos de regulación de los que es responsable para poder afirmarlo categóricamente.

4.4.2. Efectos metabólicos

PPARβ/δ participa en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y lípidos, activando la oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo, músculo esquelético y corazón, y regulando el tráfico de colesterol y el almacenamiento lipídico en macrófagos (Vosper y col., 2001; Oliver y col., 2001; Gilde y col., 2003). Como se deduce de su implicación metabólica, PPARβ/δ parece una diana farmacológica ideal para el tratamiento de la obesidad, diabetes y dislipidemias, puesto que como se ha comprobado tanto en ratones obesos (Wang y col., 2003) como en diabéticos db/db (Leibowitz y col., 2000), ligandos sintéticos específicos para esta isoforma contribuyen a normalizar el perfil lipídico y apolipoproteico característico de estas patologías.

OBJETIVOS

La hipertensión es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por presentar niveles elevados de citoquinas proinflamatorias circulantes (Pauletto y Rattazzi, 2006; Savoia y Schiffrin, 2006; Marchesi y col., 2008) y un incremento en la producción de ROS (Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001a; Zhou y col., 2003; Lee y Griendling, 2008). El hecho de que el estrés oxidativo active factores de transcripción redox sensibles implicados en la expresión de citoquinas y de enzimas proinflamatorias (Roshak y col., 1996; Chun y Suhr, 2004; Tsatsanis y col., 2006), sugiere que el estado inflamatorio vascular asociado a la hipertensión podría ser dependiente del incremento en los niveles de ROS. Entre las enzimas cuya actividad y expresión se encuentra incrementada en esta patología vascular se encuentra COX-2. Puesto que COX-2 se induce tanto por diversos estímulos proinflamatorios (Sakai y col., 2001; El Haroun y col., 2004; Briones y col., 2005; Vila-del Sol y Fresno, 2005) como por la producción de ROS (Peng y col., 2005), se puede proponer la existencia de un nexo entre la expresión de esta enzima, el incremento en el estrés oxidativo y el estado inflamatorio vascular.

La angiotensina II, principal péptido efector del sistema renina-angiotensina, es uno de los principales mediadores implicados en las alteraciones estructurales y funcionales, al igual que en la inflamación vascular, descritas en la hipertensión. Este péptido contribuye al incremento de la producción de citoquinas proinflamatorias (Sanz-Rosa y col., 2005a; 2005b), el estrés oxidativo (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000; Pueyo y col., 2000; Seshiah y col., 2002; Zhou y col., 2003) e induce la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Ohnaka y col., 2000; Hu y col., 2002; Beltrán y col., 2009). Puesto que la expresión de COX-2 está relacionada con la producción de ROS, el incremento en la expresión de esta enzima observada en la hipertensión podría relacionarse con el incremento en la actividad del RAS y sus acciones prooxidantes y proinflamatorias.

Los PPARs, son receptores nucleares expresados en la pared vascular (Schiffrin y col., 2003; Hsueh y Bruemmer, 2004; Wu y col., 2004) que ejercen acciones antiinflamatorias a través de mecanismos implicados en la reducción del estrés oxidativo (Sung y col., 2006) y/o por la inhibición de factores de transcripción proinflamatorios responsables de la expresión de citoquinas o de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Mendez y Lapointe, 2003; Cuzzocrea y col., 2004). Debido a sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias, los PPARs podrían ser fundamentales en la inhibición de la expresión de COX-2 inducida por el incremento de la actividad del RAS o por la exposición crónica a citoquinas que se observa en la hipertensión. El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar si existen alteraciones en la expresión de COX-2 y otras enzimas implicadas en el estrés oxidativo y la inflamación vascular observada en la hipertensión en relación con la exposición a citoquinas proinflamatorias y al incremento en la activación del sistema renina-angiotensina y, si los PPARs, a través de sus acciones antiinflamatorias y antioxidantes, pueden contribuir a regular negativamente estas alteraciones.

Por todo ello, los objetivos concretos de este trabajo han sido analizar:

1- Si la hipertensión produce alteraciones en la expresión vascular de COX-2 asociadas al incremento en la actividad del sistema renina angiotensina y si estas alteraciones se relacionan con los niveles de expresión de los receptores PPAR.

2- El papel de las especies reactivas de oxígeno sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β.

3- Si los niveles de expresión de PPARγ y/o su activación contribuyen a la regulación de la expresión de COX-2 y de otras enzimas implicadas en el estado inflamatorio vascular inducido por IL-1β, y si este efecto podría llevarse a cabo a través de mecanismos relacionados con la reducción del estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron segmentos de aorta torácica de ratas macho SHR (ratas espontáneamente hipertensas) y su control normotenso WKY (Wistar Kyoto), criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Una vez sacrificados los animales, se obtuvieron segmentos de aorta procedentes de ratas de ambas cepas tanto recién extraídos (basal) como incubados durante seis horas en solución de Krebs-Henseleit (KHS) (6 horas), en los cuales se analizó la existencia de alteraciones en la expresión del ARNm de COX-2 y PPARs por RT-PCR a tiempo real. Para comprobar si el sistema renina-angiotensina circulante estaba implicado en esas alteraciones se determinaron, en iguales condiciones, los niveles de expresión en segmentos aórticos de animales tratados con el antagonista del receptor AT-1 de la angiotensina II losartán. Con el objetivo de analizar si la inducción de COX-2 por angiotensina II era dependiente del incremento del estrés oxidativo se analizó la expresión de la proteína en cultivos de CMLV de SHR estimulados con angiotensina II en presencia de inhibidores de las principales fuentes de producción de anión superóxido a nivel vascular.

Se utilizaron también CMLV de aorta procedentes tanto de ratas SHR como de ratas WKY estimulados con la citoquina proinflamatoria IL-1β. Para determinar si la IL-1β inducía la expresión de COX-2 y la de otras enzimas relacionados con el estado redox celular y la respuesta inflamatoria a través del incremento en la producción de anión superóxido por la NAD(P)Hox, se trataron cultivos de CMLV de ambas cepas estimulados con IL-1β con un inhibidor de esta enzima. Para analizar el mecanismo de regulación que ejercen los PPARs sobre la inducción de la expresión de COX-2 por IL-1β, se trabajó en cultivos de CMLV procedentes tanto de ratas WKY y de ratas SHR estimuladas con la citoquina, en ausencia y presencia de activadores de las isoformas γ y α. El efecto de alteraciones en la expresión de PPARγ sobre la expresión de COX-2 y otros genes implicados en el estado redox celular se llevó a cabo transfectando CMLV de SHR estimuladas con IL-1β con un ARN de interferencia específico para PPARγ. Además, se analizó el efecto de la activación de PPARα sobre la expresión de COX-2 y endotelina-1 en la línea celular de endotelio microvascular humano HMEC-1.

1. GRUPOS DE ANIMALES Y TRATAMIENTOS

1.- Ratas WKY

2.- Ratas SHR

3.- Ratas WKY tratadas con losartán (15 mg/Kg/día) durante 12 semanas

4.- Ratas SHR tratadas con losartán (15 mg/Kg/día) durante 12 semanas

2. OBTENCIÓN DE AORTA TORÁCICA PARA EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

El día anterior a la extracción de los tejidos, y con el fin de evitar contaminación por ARNasas exógenas, se autoclavó y preparó cuidadosamente el material de disección así como los tubos eppendorf donde se almacenaran los segmentos aórticos hasta su procesamiento. Inmediatamente después del sacrificio de los animales, se extrajo la aorta torácica y se introdujo en una solución de KHS a 4º C burbujeada con carbogeno (95% de CO_2 y 5% de O_2, pH=7.4), donde se eliminó el tejido adiposo perivascular. La composición del KHS fue la siguiente: NaCl 115 mM; KCl 4.6 mM; CaCl 2.5 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 1.2 mM; $NaHCO_3$ 25 mM; Glucosa 11.1 mM; Na_2EDTA 0.01 mM.

Una vez limpia, la aorta torácica se dividió en segmentos de aproximadamente 2 mm de longitud, que se distribuyeron en dos grupos; en un grupo los segmentos se congelaron inmediatamente en N_2 líquido (situación basal) y se almacenaron a -80º C hasta su procesamiento; en el segundo grupo, los segmentos se incubaron durante 6 horas en KHS a 37º C y burbujeado con carbógeno, para simular las condiciones de experimentos previos funcionales de reactividad vascular llevados a cabo por el grupo. Tras la incubación, los segmentos aórticos fueron congelados y se almacenaron a -80º C hasta su procesamiento.

3. CULTIVOS CELULARES

Se trabajó con cultivos celulares primarios de CMLV de aorta procedentes tanto de ratas SHR como WKY, obtenidos por explante tisular, como se indica a continuación.

3.1. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLV

Todo el material de disección se mantuvo en etanol al 70% para asegurar su esterilidad. De forma inmediata al sacrificio del animal, se aisló la aorta y se introdujo en un tubo con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco´s modified Eagle´s medium*), conteniendo L-glutamina, Piruvato, D-glucosa (todos a una concentración de 1 g/l), y suplementado con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.1%, con $NaHCO_3$ a una concentración final del 0.08% para estabilizar el medio, y con penicilina y estreptomicina a una concentración de 200 U/ml y 200 µg/ml, con el objeto de reducir la probabilidad de contaminación.

A partir de este momento, y con el fin de preservar la esterilidad, se siguió trabajando dentro de una campana de cultivo de flujo laminar (NuAIRE 425-300E clase 2, NuAIRE, Plymouth, USA), situando la arteria fija en una placa cuya superficie está cubierta con silicagel, para permitir una mayor manejabilidad de la arteria, y se eliminó la grasa perivascular bajo una lupa Leica S6D (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Una vez limpia la arteria, se incubó a 37º C con colagenasa a una concentración de 2 mg/ml disuelta en DMEM con BSA al 0.1%, para facilitar la eliminación mecánica de la capa adventicia vascular, variando el tiempo de incubación según la cepa. Así, las aortas procedentes de ratas WKY se incubaron durante 30 minutos, mientras que las procedentes de SHR se incubaron durante 45 minutos.

Transcurrido el tiempo de incubación con colagenasa, la arteria se colocó de nuevo en DMEM con BSA al 0.1% a 4º C y bajo la lupa se eliminó la capa adventicia usando pinzas de disección. A continuación, la arteria se colocó en una placa y se troceó en fragmentos de aproximadamente 1-2 mm^2 que se colocaron en frascos de cultivo de tapón ventilado de 25 cm^2 con 4 ml de medio DMEM suplementado al 10% con suero

fetal de ternera (FCS) descomplementado, $NaHCO_3$ a una concentración final del 0.08% y con una mezcla de penicilina y estreptomicina a unas concentraciones finales de 100 U/ml y 100 μg/ml, respectivamente, para prevenir posibles contaminaciónes bacterianas.

3.2. CRECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLV

Los frascos fueron colocados en un incubador (NuAIRE US Autoflow, NuAIRE) a 37º C y 5% de CO_2, y transcurridos unos días se comprobó la aparición de CMLV procedentes de los explantes adheridas a la placa. Durante ese tiempo el medio de incubación fue reemplazado cada 48-72 horas, antes de que su color virara a amarillo (el rojo fenol es el indicador de pH que lleva el medio, cambiando de color hacia el amarillo ante una acidificación del mismo). Las células se caracterizaron por la presencia de "colinas" y "valles" propios de este tipo celular, y por la tinción inmunocitoquímica positiva con el anticuerpo anti α-actina (1:200, Sigma Chemical, St Louis, CO, USA) y negativa para el anticuerpo anti-vimentina (1:200, Sigma Chemical) (Fig. 20). Una vez alcanzado el 85-100% de confluencia, se retiró el medio de cultivo y las CMLV se lavaron con PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} 3 veces, manteniéndose el tercer lavado durante 5 minutos a 37º C, para favorecer la disgregación intercelular. A continuación, se retiró el medio de lavado y se incubó 1 minuto a 37º C con tripsina-EDTA al 0.05%, para despegar las células. Se diluyeron las células y la tripsina añadiendo DMEM con FCS al 10% y se sembraron en frascos de 25 cm^2 para aumentar el número de pase, o en placas de 6 pocillos (Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrech, Alemania) con un volumen de 2 ml de DMEM con FCS al 10% por pocillo para llevar a cabo los tratamientos.

Cada tripsinización o pase se llevó a cabo, como frecuencia media, cada 5-7 días. Debido al proceso de senescencia que sufren las células, la capacidad proliferativa disminuyó con el número de pases, por lo que se fijó el décimo pase como límite para su utilización.

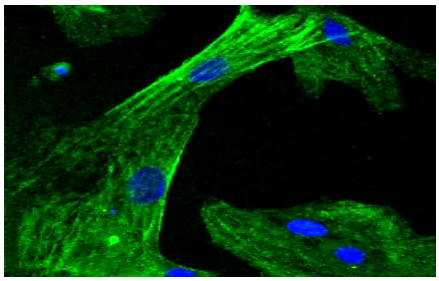


Fig. 20: Fotografía de CMLV en la que se puede apreciar las fibras de α-actina, marcador característico de este tipo celular, marcadas en verde y los núcleos en azul. Las células se tiñeron con un anticuerpo primario anti α-actina procedente de ratón y uno secundario anti-ratón FITC (Ex 494 nm; Em 518 nm) y con Hoechst 33342 (Ex 364 nm, Em 461 nm) y se visualizaron mediante un microscopio confocal Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems) con un objetivo de 63X (Zoom 2X).

3.3. CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR HMEC-1 (HUMAN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS-1)

La línea celular HMEC-1 fue una donación de Francisco J. Candal (*Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, Georgia). Las células microvasculares endoteliales humanas se inmortalizaron transfectando con el virus SV-40. Las células se crecieron en placas petri de 10 cm^2 en 10 ml de medio MCDB131 suplementado con FCS al 10%, glutamina 2 mM, gentamicina 25 μg/ml, hidrocortisona 1 μg/ml y 10 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico) y se colocaron en el incubador a 37º C y 5% de CO_2. El medio de incubación fue reemplazado cada 24 horas, antes de que el rojo fenol virara a amarillo. Una vez alcanzado el 100% de confluencia, se procedió a tripsinizar las células con el fin de preparar los experimentos. Para ello, se retiró el medio de crecimiento y se lavó con 1 ml de tripsina-EDTA al 0.05%. A continuación se incubó de 1-2 minutos a 37º C con tripsina-EDTA al 0.05% hasta lograr despegar las células. Se diluyeron las células y la tripsina añadiendo MCDB131 con FCS al 10%, hidrocortisona 1 μg/ml y EGF 10 ng/ml y se sembraron en placas de 6 pocillos en un volumen de 2 ml en cada uno. Cada tripsinización o pase se llevó a cabo dependiendo de la tasa proliferativa del cultivo, estableciéndose como frecuencia media 2-4 días. Debido a que la línea celular HMEC-1 es inmortal, la capacidad proliferativa no se vio afectada significativamente con el número de pases, por lo que se llegó a trabajar incluso a pase 23.

3.4. TRATAMIENTOS DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CMLV

Una vez alcanzada la confluencia se ayunaron los cultivos de CMLV durante 24 horas en un medio libre de suero con el objetivo de mantener las células en estado quiescente. Para ello, se retiró el medio DMEM con FCS al 10% y se sustituyó en cada pocillo por 1 ml de DMEM con BSA al 0.1%. Para analizar el efecto de la angiotensina II sobre la expresión de COX-2, las células fueron estimuladas con este péptido durante 2 horas con o sin pretratamiento con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa apocinina a una concentración de 30 μM y con el inhibidor de la xantina oxidasa alopurinol a una concentración de 10 μM.

Para analizar los efectos de la IL-1β sobre la transcripción de COX-2 y otras enzimas implicadas en la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo, CMLV procedentes de ambas cepas se incubaron durante 24 horas con la citoquina. El efecto de la activación de PPARγ y PPARα sobre el estrés oxidativo y la inducción de COX-2 se llevó a cabo tratando durante 18 horas con los distintos fármacos; se emplearon pioglitazona y fenofibrato, como activadores de PPARγ y PPARα, respectivamente, a una concentración de ambos de 10 μM. Para analizar el papel del anión superóxido procedente de la NAD(P)H oxidasa vascular se usó apocinina a una concentración de 30 μM, y para analizar el papel del H_2O_2 se utilizó catalasa a una concentración final de 1000 U/ml. Tras las 18 horas de tratamiento, se activaron los cultivos de CMLV añadiendo interleuquina-1β (10 ng/ml) manteniéndose en estas condiciones durante 24 horas. El efecto de la adición exógena de H_2O_2 se analizó exponiendo cultivos de CMLV de SHR a esta especie reactiva de oxígeno a una concentración de 50 μM durante 90 minutos.

3.5. TRATAMIENTO DE CULTIVOS DE HMEC-1

Previo al tratamiento con el activador de PPARα fenofibrato, se ayunaron los cultivos de HMEC-1 durante 24 horas en un medio de baja concentración de suero con el objetivo de mantener las células en estado quiescente. Para ello, se retiró el medió MCDB131 con FCS al 10% y se sustituyó en cada pocillo por 1 ml de MCDB131 con FCS a 0.2 %. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo el tratamiento durante 24 horas con fenofibrato a una concentración final de 100 μM para analizar los efectos de la activación de PPARα sobre la transcripción de endotelina-1 y COX-2.

4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE COX-2

La expresión de la proteína de COX-2 se llevó a cabo por técnicas de Western blot. Tras dos horas de estimulación con angiotensina II, en presencia y ausencia de apocinina y alopurinol, se lavaron los cultivos 2 veces con PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} frio y se añadieron 200 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM pH=7.4, ortovanadato sódico 10 mM y SDS al 1%), raspándose las células y recogiéndose los lisados celulares en tubos eppendorf de 1.5 ml. Los homogenados se centrifugaron a 10000xg para eliminar material insoluble. Los extractos celulares fueron cuantificados por colorimetría utilizando el método de Lowry (1951) (BioRad DC Protein Assay, BioRad California laboratories, Hercules, California, USA). Se calculó el volumen de muestra necesario para cargar 20 μg de lisado celular y se añadió un volumen igual de tampón de carga o tampón *Laemli* a pH=8.0 (urea 0.5 mM, SDS 0.17 mM, ditiotreitol 39 μM, Tris 0.01 M y azul de bromofenol). La mezcla se incubó a 95º C durante 4 minutos para desnaturalizar las proteínas.

En un sistema de electroforesis Mini Protean (BioRad), se polimerizaron dos geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), gel 1 o gel separador y gel 2 o gel concentrador. Los geles se introdujeron en una cubeta llena de tampón de electroforesis (Tris 25 mM, Glicina 0.2 M y SDS 0.1%), y las muestras se cargaron en el gel concentrador, que contiene acrilamida al 3%, Tris (pH=6.8) al 1.49%, SDS al 0.1%, persulfato amónico (APS) al 0.98% y TEMED al 0.063%. A continuación se llevó a cabo la electroforesis aplicando un voltaje constante de 100 mV, haciendo que las muestras pasasen por el gel concentrador primero y por el gel separador después. El gel separador contenía Tris (pH=8.8) al 4.6%, SDS al 0.1%, glicerol al 3.4%, APS al 0.038% y TEMED al 0.033% y una concentración de acrilamida de 7.5%. Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF Transfer membrane Hybond P, Amersham International plc, Little Chalfont, Reino Unido) 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 BioRad Transblot cell (Bio-Rad), inmersos en tampón de transferencia al que se le aplicó una intensidad eléctrica de 230 mA. El tampón de transferencia está compuesto por Tris 25 mM, Glicina 120 mM, metanol al 20% y SDS al 0.05%.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se trataron durante 2 horas a 4 ºC en agitación continua con solución de bloqueo (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, 0.1% Tween 20 y 5% de leche desnatada en polvo) para evitar uniones inespecíficas tras incubar con los distintos anticuerpos. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de COX-2 (anticuerpo policlonal de conejo anti-COX-2 1:1000, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) o de α-actina (anticuerpo monoclonal de ratón anti-α-actina 1:3000000, Sigma Chemical) diluidos en solución de bloqueo toda la noche a 4º C en agitación

continua. La expresión de α-actina se utilizó para corregir la expresión de COX-2 en cada muestra. Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 4 lavados sucesivos de las membranas con solución de lavado para eliminar restos de anticuerpo primario no reactivo. Tras los lavados, se incubaron las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario, que será anticuerpo IgG anti-ratón (1: 2000, Stressgen, Victoria, Canada) cuando las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de α-actina o anticuerpo IgG anti-conejo (1:2000, BioRad) si el anticuerpo primario con el que se incubaron las membranas era frente COX-2. Ambos anticuerpos secundarios están conjugados con peroxidasa de rábano. 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 (ECL-plus, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Las membranas se expusieron a una película (Hyperfilm ACL, Amersham International), que se reveló y las señales del inmunoblot se cuantificaron usando el programa informático "*NIH Image Program v 1.56"* para PC.

5. TRANSFECCIÓN DE ARN DE INTERFERENCIA ESPECÍFICO PARA PPARγ EN CULTIVOS DE CMLV PROCEDENTES DE RATAS SHR

Para comprobar si los niveles de expresión de PPARγ 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-1β con siRNA (*short interfering RNA*) específico para PPARγ. Aproximadamente 24 horas antes de la transfección de los cultivos de CMLV de ratas SHR con los siRNA, se sembraron (60.000-80.000 células por pocillo) en placas de 6 pocillos en un volumen de 1 ml de DMEM suplementado con FCS al 10%, con el objetivo de tener en el momento de la transfección, aproximadamente, un 50% de confluencia y favorecer el proceso. Tres horas antes de la transfección, se sustituyó el medio de crecimiento por DMEM con BSA al 0.1%. Una vez las células se estabilizaron, se transfectaron durante 24 horas con siRNA específico para PPARγ (*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 resuspensión buffer*, Qiagen- IZASA, Barcelona, España) a una concentración final de ambos de 5 nM, usando como agente transfectante *HiPerfect Transfection Reagent* (Qiagen- IZASA).

A continuación se indica la secuencia del siRNA para PPARγ empleado:

siRNA PPARγ

Sense	**(CAA UGG UUG CUG AUU ACA A)dTdT**
Antisense	**(UUG UAA UCA GCA ACC AUU G)dGdG**

Tras la transfección, se estimularon las células durante 24 horas añadiendo interleuquina-1β (10 ng/ml) en el medio en el que se llevó a cabo la transfección.

6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL ARNm

6.1. EXTRACCIÓN ARN TOTAL

6.1.1. Extracción del ARN total de segmentos aórticos de rata

Previo a la extracción del ARN total, se preparó y esterilizó el material, para evitar contaminación con ARNasas. Para ello, el vástago del politrón a utilizar se introdujo durante 4 horas en un horno (Heraeus T5050, Hanau, Alemania) a 200º C y se mantuvo durante 6 horas en una solución de NaOH 50 mM preparada en agua bidestilada autoclavada y tratada durante toda la noche anterior con 0.01% de dietilpirocarbonato (DEPC), un inhibidor de ARNasas. Tras finalizar el tratamiento, se autoclavó el vástago y se mantuvo en condiciones estériles hasta su utilización. Los tubos en los cuales se iba a llevar a cabo la homogenización se introdujeron durante la noche anterior al procesamiento del tejido en una solución de NaOH 50 mM preparada con agua tratada con DEPC. Una hora antes del comienzo de la extracción, se eliminó por completo el NaOH de los tubos, lavando repetidas veces cada tubo con agua tratada con DEPC para evitar alteraciones en el pH que puedan afectar a la extracción.

Las muestras de segmentos aórticos fueron homogenizadas en frío con un Politrón (PT-2010, Kinematica AG, Lucerna, Suiza) a 10000xg durante 10 minutos en 1 ml de Trizol, buffer específico para la extracción y preservación de ARN total en un solo paso, por el método modificado de Chomczynski y Sacchi (1987). El Trizol produce la ruptura de las células al disolver lípidos y precipitar proteínas, preservando la integridad del ARN. A continuación se recogieron los sobrenadantes, a los que se añadieron 200 µl de cloroformo. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó a 12000xg a 4º C durante 15 minutos. La adición de cloroformo junto con la centrifugación siguiente permite la separación de dos fases, una orgánica y otra acuosa, en la cual permanecerá el ARN.

Para precipitar el ARN total se añadieron 500 µl de isopropanol y 10 µg de glucógeno, cuya función será formar complejos con los ácidos nucleicos que permitan la formación de precipitados visibles y fácilmente manipulables. Esta mezcla se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó posteriormente a 4º C a 12000xg durante 30 minutos. Los precipitados se lavaron con 800 µl de etanol al 75% preparado en agua DEPC, y se centrifugaron a 7500xg a 4º C. A continuación, se retiró el etanol, y se dejaron secar los precipitados al aire asegurando la completa eliminación de etanol, pues es un potente inhibidor de las siguientes reacciones enzimáticas a las que se someterán las muestras. Los precipitados se resuspendieron

en 10-15 µl de agua DEPC filtrada y conservada a -20º C especialmente para resuspender los ARN obtenidos. Finalmente, las muestras se almacenaron a -80º C hasta llevar a cabo la retrotranscripción.

6.1.2. Extracción del ARN total de cultivos de CMLV

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 con PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} conservado a 4 ºC. Una vez eliminado el PBS, se añadió 1 ml de Trizol a cada pocillo y se lisaron las células en frío pipeteando arriba y abajo varias veces el lisado celular disuelto en el Trizol. Este lisado se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a -80 ºC hasta tener todas las muestras necesarias para cada uno de los ensayos.

Para la extracción del ARN total, se siguió el mismo protocolo que en los segmentos aórticos, pero aumentando la velocidad de centrifugación en la fase de lavado de los precipitados resultantes de la centrifugación de la mezcla con isopropanol y glucógeno. Así, los precipitados a los que se había añadido etanol al 75% en agua DEPC, se centrifugaron a 10000xg para favorecer la adhesión al fondo del tubo y evitar que los precipitados se disgreguen. Tanto los volúmenes de resuspensión como el modo de almacenamiento fueron idénticos a los llevados a cabo con los segmentos aórticos.

6.2. CUANTIFICACIÓN DEL ARN TOTAL

Para la cuantificación del ARN total extraído tanto de cultivos celulares como de segmentos aórticos, se prepararon por duplicado diluciones de 1 µl de cada muestra con agua mili-Q autoclavada y filtrada hasta completar un volumen final de 50 µl. Esta dilución se colocó en cubetas de plástico de calidad espectrofotométrica (UVette, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se cuantificó en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf), midiendo la absorbancia a unas longitudes de onda de 260 nm y 280 nm sabiendo que:

1 unidad A_{260} de ARN monocatenario = 40 µg/ml

Se calculó la absorbancia a 260 nm y 280 nm para calcular la relación entre ambas longitudes de onda y estimar la calidad del ARN y la pureza de cada muestra, considerando que una solución pura al 100% de ARN tiene una relación entre la absorbancia obtenida a 260 nm y 280 nm de longitud de onda de 2 ± 0.05; se descartaron muestras cuya relación (Abs 260/280) fuera inferior a 1.8.

6.3. VISUALIZACIÓN DEL ARN TOTAL POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Una vez cuantificado el ARN total obtenido, se mezcló 1 µg de ARN con tampón de carga de ARN desnaturalizante compuesto de formaldehído al 18.5%, formamida al 50%, MOPS 40 mM, Ficoll al 4% y azul de bromofenol como marcador del frente de la electroforesis. A esta mezcla se le añadió bromuro de etidio a una concentración de 0.1 µg/µl y se calentó a 95º C con el fin de desnaturalizar el ARN. La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% disuelta en tampón MOPS y formaldehido 0.6 M en condiciones desnaturalizantes.

A continuación, se procedió a la electroforesis a 80 V en un sistema horizontal de electroforesis (Mini Subcell GT System, BioRad) conectado a una fuente de alimentación Power-Pac 200 (BioRad). El ARN total, debido a la capacidad del bromuro de etidio de hidrolizarse en presencia de luz ultravioleta y emitir fluorescencia, se visualizó en un transiluminador ultravioleta (*UVP Mini dark room transilluminator*, UVP, Upland, Ca, USA) acoplado al programa de análisis de imagen "*Labworks Analysis Image*" (UVP) para PC. Se consideraron como aptos todos los ARNs que permitían apreciar las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 18S y 28S sin degradación (Fig. 21).

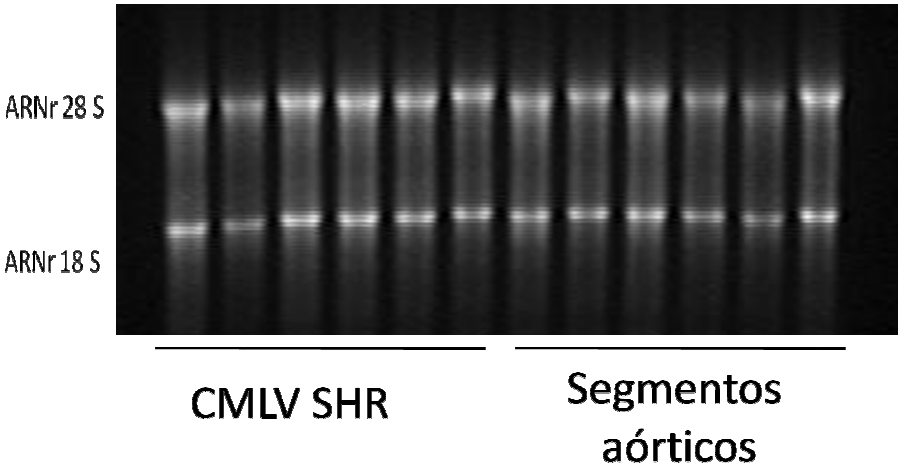


Fig. 21: Fotografía del resultado de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de agarosa al 1% cargado con los distintos ARNs totales extraídos de segmentos arteriales y cultivos de CMLV procedentes de ratas SHR utilizando el protocolo modificado de Chomczynski y Sacchi (1987). En la parte superior se puede observar la banda correspondiente al ARN ribosomal 28S (ARNr 28S) y en la inferior banda del ARN ribosomal 18S (ARNr 18S).

6.4. RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN OBTENIDO

Una vez determinada la calidad del ARN, para evitar posibles contaminaciones con ADN genómico, se trataron 10 µg de ARN con 10 unidades de ADNasa I (*DNase I recombinant, RNase free*, Roche, Mannheim, Alemania) a 37º C. La reacción se paró añadiendo 2 µl de EDTA (pH=8.0) a 0.2 M e inactivando la enzima por calor al incubar a 75º C durante 10 minutos.

La retrotranscripción del ARN se realizó con un kit comercial (*High-Capacity cDNA Archive*, Applied Biosystems Hispania, Madrid, España), el cual usa una variante de alta eficacia y rendimiento de la enzima *Multiscribe Reverse Transcriptase*. Así, 1 µg de cada ARN total se resuspendió en agua libre de nucleasas hasta un volumen de 9 µl. A cada una de estas muestras, se le añadieron 11 µl de la siguiente mezcla de reacción, completando de ese modo un volumen final de 20 µl:

Mezcla de reacción	Concentración
Buffer comercial específico para retrotranscripción	1X
dNTP	1 mM
$MgCl_2$	5 mM
Hexámeros al azar	2.5 µM
Inhibidor de ARNasas	20 U
Retrotranscriptasa	50 U

Una vez preparadas las reacciones, se introdujeron en un termociclador (*Mastercycler Gradient*, Eppendorf) donde se llevó a cabo la reacción, definiendo un único ciclo con los siguientes pasos: 10 minutos a 25º C y 2 horas a 37º C. Se añadió un último paso a 70º C durante 5 minutos para inactivar la retrotranscriptasa.

Finalizada la retrotranscripción, y asumida un 100% de eficacia en la conversión del ARN total a ADNc, los ADNc se almacenaron a -20º C hasta su posterior utilización.

6.6. PCR A TIEMPO REAL

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*") de 18-22 pb, marcadas en el extremo 5´ con 6-FAM como fluorocromo reportero, cuyo máximo de emisión está a la longitud de onda de 535 nm. En situación de no amplificación, no se detecta fluorescencia debido a que este fluorocromo permanece neutralizado por otro, el TAMRA situado en el extremo 3´, por medio de transferencia de energía de tipo Forster (FRET). En esta transferencia, la energía de baja longitud de onda del fluoróforo situado en el extremo 5´ es transferida al fluoróforo de energía de mayor longitud de onda ubicado en el extremo 3´, bloqueándose la liberación de fluorescencia. De ese modo, se necesita la hidrólisis de la sonda para que el fluoróforo reportero quede libre del fluoróforo secuestrador y, por lo tanto, se emita fluorescencia. Iniciada la PCR, los cebadores hibridan con sus secuencias específicas en sus ADNc dianas y la polimerasa comienza a amplificar. Una vez alcanzada la zona de hibridación de la sonda Taqman, y debido a la capacidad 5´ exonucleasa de la polimerasa usada, tras hidrolizarse el fluoróforo reportero fijado en la sonda se liberará fluorescencia, la cual será registrada por un sistema capaz de detectar la fluorescencia emitida en el rango del espectro de emisión del fluoróforo reportero utilizado (Fig. 22). Por lo tanto, se necesita la hibridación específica tanto de los cebadores como de las sondas para que la amplificación y la detección del producto sean posibles.

Las sondas utilizadas fueron de diseño comercial (*Taqman gene expression assays*, Applied Biosystems Hispania) y constan de una mezcla de una pareja de cebadores de alta eficiencia, cuyas regiones complementarias están ubicadas en distintos exones del ARNm a analizar, y de la sonda Taqman marcada con FAM, la cual hibrida con un segmento interior de la secuencia a analizar, que comprende a los dos exones en cuyos extremos se sitúan los cebadores. De este modo, la construcción permite amplificar productos pequeños, entre 100-200 pb, con muy alta especificidad y sensibilidad respecto al método de amplificación que utiliza SYBR green como fluoróforo reportero, minimizando a su vez la posibilidad de amplificación de ADN genómico, al ser estrictamente necesario el procesamiento intrónico para la hibridación tanto del par de cebadores como de la sonda taqman y, por lo tanto, para la detección del producto amplificado.

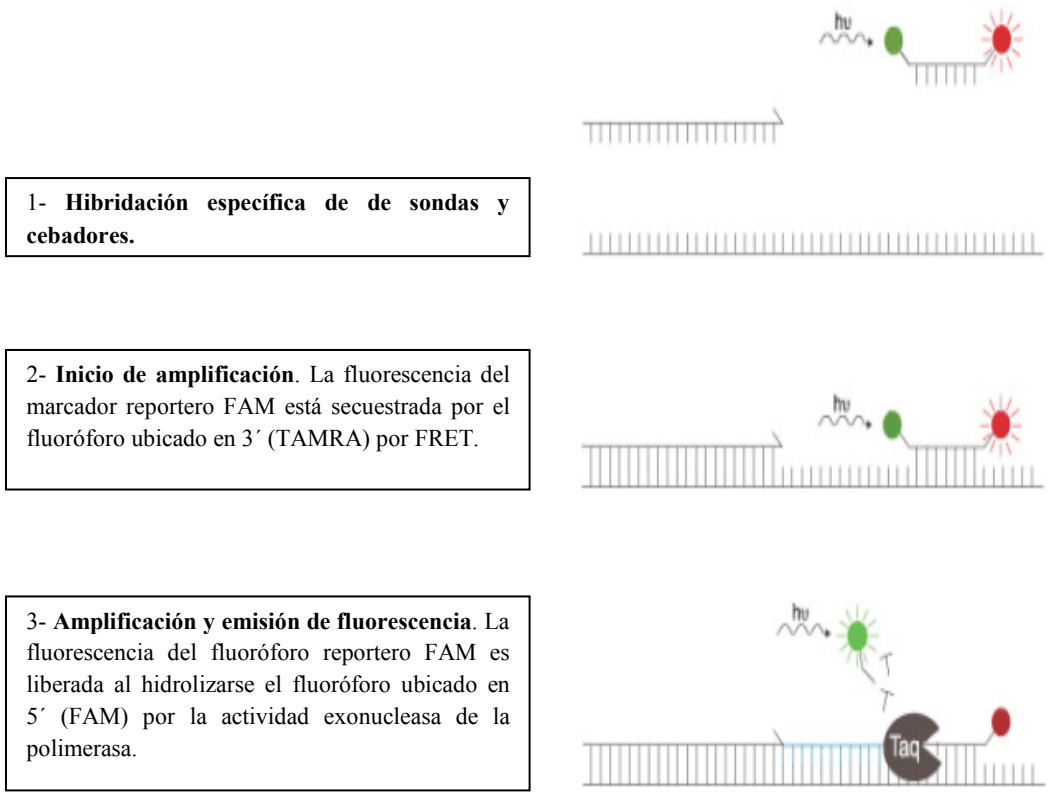


Fig. **22**: Esquema mostrando los distintos pasos de la PCR a tiempo real y el principio que permite relacionar la emisión de florescencia con la cantidad de producto amplificado.

Las reacciones se prepararon en placas de 96 pocillos *(MicroAmp optical 96 well reaction plate,* Applied Biosystems Hispania), analizándose cada muestra por duplicado; en el caso de genes de menor expresión, la muestra se analizó por triplicado. Cada reacción se preparó en una campana de flujo laminar (Mini-V / PCR, Telstar, Madrid, España), previamente esterilizada por luz ultravioleta, en un volumen final de 20 µl conteniendo:

9 µl de ADNc diluido con agua libre de nucleasas, a una concentración específica determinada previamente por curvas de concentración específicas para cada ADNc a amplificar. Para estas curvas se usó una mezcla de ADNc de todas las situaciones experimentales a analizar.

11 µl de mezcla de reacción. Esta mezcla consta de lo siguiente:

10 µl de *Taqman Universal PCR Mastermix* 2X con ROX como fluorocromo para control de carga de la mezcla (Applied Biosystems Hispania).

1 µl de mezcla 20 X de Sonda Taqman y del par de cebadores específicos para cada gen.

Una vez preparadas las reacciones, se sellaron con papel adhesivo óptico (*MicroAmp Optical Adhesive Film*, Applied Biosystems Hispania), el cual no interfiere con la emisión de fluorescencia pero si evita la evaporación durante los periodos de desnaturalización.

Se llevaron a cabo PCRs previas con los distintos pares de cebadores y sondas taqman utilizados para amplificar cada ADNc utilizando distintas concentraciones de ADNc, con el fin corroborar que la eficacia de amplificación obtenida era del 100%. Los ARNm amplificados fueron:

ARNm a analizar	**Referencia (Applied Biosystems)**	**ng de ADNc en cada reacción**
COX-2	Rn00568225_m1	20 ng
PPARγ	Rn00440945_m1	100 ng
PPARα	Rn00566193_m1	100 ng
SOD-1	Rn00566938_m1	20 ng
SOD-2	Rn00566942_g1	40 ng
NOX-1	Rn00586652_m1	40 ng
CATALASA	Rn00560930_m1	20 ng
ENDOTELINA-1	Rn00561129_m1	30 ng

El programa de amplificación usado fue:

1- Incubación inicial: 50º C, 2 minutos.

2- Desnaturalización inicial: 95 º C, 10 minutos.

3- 40 ciclos: 95º C, 15 segundos y 60º C, 1 minuto.

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. Se utilizaron dos controles endógenos para normalizar los resultados:

ARNm a analizar	Referencia (Applied Biosystems)	ng de ADNc en cada reacción
β_2 microglobulina	Rn00560865_m1	20-100 ng
Ciclofilina D	Rn01458750_g1	20-100 ng

En general se utilizó β_2 microglobulina como control endógeno para corregir los valores de expresión obtenidos por la cantidad de carga de ADNc, salvo en los experimentos de ARN de interferencia y cuando se compararon cultivos de CMLV procedentes de SHR y WKY, en cuyo caso se utilizó ciclofilina D. La razón de esto estriba en que en experimentos en CMLV procedentes de aorta de ratas WKY y SHR se detectó regulación en la expresión de este gen asociada a la patología hipertensiva (Fig. 23). De igual manera, el proceso de transfección con el ARN de interferencia específico para PPARγ también modificó la expresión de β_2 microglobulina (Fig. 24).

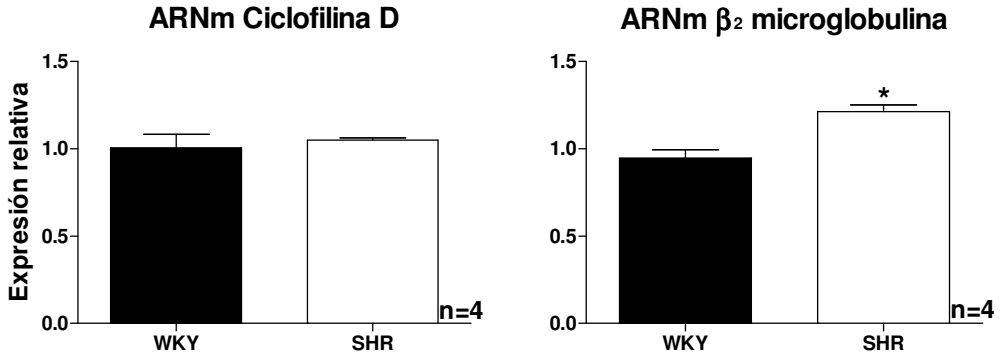


Fig. 23: Expresión relativa del ARNm de β_2 microglobulina y ciclofilina D en CMLV de aorta procedentes de SHR respecto a WKY. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

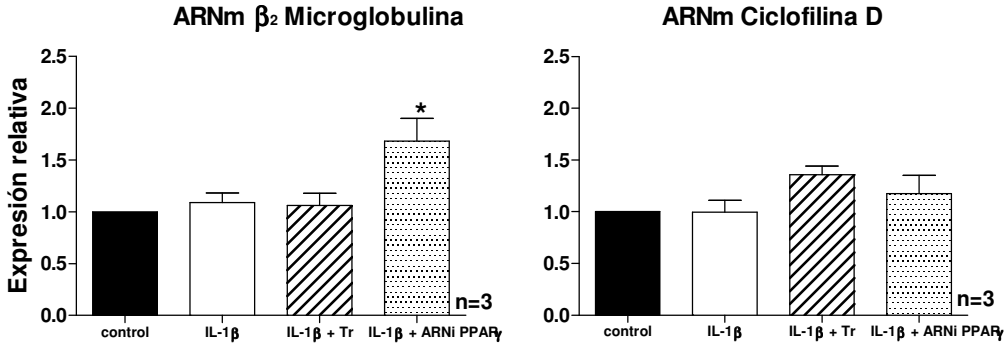


Fig. 24: Expresión relativa del ARNm de β_2 microglobulina y ciclofilina D en CMLV de aorta de SHR en ausencia de estímulo (control), estimuladas con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en ausencia y en presencia de siRNA específico para PPARγ (5 nM) (IL-1β + ARNi PPARγ) y del agente transfectante utilizado (IL-1β + Tr). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por ANOVA de una vía.

Una vez finalizada la amplificación de los distintos ADNc, se prepararon geles de agarosa al 2% en Tampón TAE (Tris acético-EDTA) a los cuales se les añadió bromuro de etidio. Los productos generados fueron cargados en el gel y sometidos a electroforesis en un sistema de electroforesis horizontal (*Mini Subcell GT*, BioRad) con tampón TAE como tampón de electroforesis a 100 V de potencia durante 1 hora.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se visualizaron con un transiluminador (*UVP Mini dark room transilluminator*, UVP) con el objetivo de visualizar los fragmentos amplificados y corroborar el resultado obtenido por la PCR a tiempo real (Fig. 25).

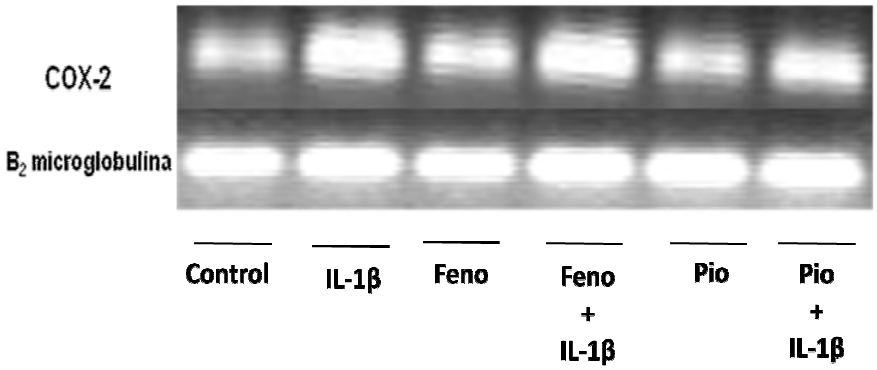


Fig. 25: Electroforesis en gel de agarosa al 2% representativa de los resultados obtenidos por PCR a tiempo real, en la cual se observa la expresión del ARNm de COX-2 en CMLV de SHR en ausencia de estímulo (control) y estimuladas con IL-1β en presencia y en ausencia de los activadores de PPARα (fenofibrato, 10 μM) y de PPARγ (pioglitazona, 10 μM) así como el efecto de los activadores solos.

7. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCION DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN CULTIVOS DE CMLV POR EL MÉTODO DEL DIHIDROETIDIO

Los niveles de anión superóxido fueron cuantificados por medio del análisis de la emisión de fluorescencia en imágenes obtenidas por microscopia confocal, usando el método del dihidroetidio (DHE). La hidroetidina es capaz de atravesar libremente las membranas celulares y en presencia de $O_2^{\cdot -}$ oxidarse transformándose en bromuro de etidio, el cual queda atrapado en el interior celular debido a su capacidad para intercalarse en el ADN. Este bromuro de etidio, al excitarse a 563 nm de longitud de onda emite fluorescencia a 610 nm.

Para llevar a cabo la detección de anión superóxido se sembraron y crecieron las CMLV cristales situados en el interior de placas de 6 pocillos. El día antes del comienzo de los tratamientos se ayunaron los cultivos de CMLV, con el objetivo de mantenerlos en estado quiescente e inactivo, en un medio libre de suero. Para ello, se retiró el medió DMEM con FCS al 10% y se sustituyó en cada pocillo por 1 ml de DMEM con BSA a una concentración de 0.1%. Las células fueron estimuladas con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas, en presencia y ausencia de pioglitazona (10 μM), la cual se añadió 18 horas antes de la estimulación con la citoquina. Transcurrido el periodo de tratamiento, se incubaron con DHE (10 μM) disuelto en medio DMEM al 0.1% de BSA durante 30 minutos a 37º C para que la sonda entre en la célula. Tras esto se tomaron imágenes por microscopía confocal (Leica TCS SP5, Leica) tanto de CMLV sometidas a los tratamientos anteriormente mencionados como de cultivos de CMLV no estimulados como situación control, usando los mismos parámetros de adquisición de datos para cada ensayo a lo largo de todo el estudio. Los valores de la intensidad de fluorescencia de 10-15 núcleos por experimento e imagen se cuantificaron usando el software de análisis de imagen "*Metamorph"*para PC. Para analizar si la IL-1β incrementaba la producción de anión superóxido se asignó el valor 1 al aumento en la fluorescencia nuclear en ausencia de estímulo (control). El efecto de la activación de PPARγ con pioglitazona en presencia de IL-

1β sobre la producción de anión superóxido se analizó asignando el valor 1 a la intensidad de fluorescencia obtenida en CMLV estimuladas con la citoquina en ausencia de tratamiento.

8. CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H_2O_2 EN CULTIVOS DE CMLV POR EL MÉTODO DE LA DICLOROFLUORESCEINA

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 estearasas intracelulares a 2'-7' diclorofluoresceína, capaz de unirse al H_2O_2 intracelular y emitir fluorescencia a una longitud de onda de 485 nm cuando se excita con una longitud de onda de 530 nm. El DFC-DA localizado en el exterior celular no será capaz de reaccionar con el H_2O_2, limitando la detección al H_2O_2 intracelular. Este método permite una cuantificación rápida y precisa de especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2, en presencia de un estímulo que active el metabolismo oxidativo.

Para llevar a cabo la detección de la producción de H_2O_2 en CMLV, se sembraron las células en placas de 24 pocillos en DMEM con FCS al 10% en número suficiente para tener al día siguiente un 40-60% de confluencia. El día siguiente a la siembra, se ayunaron los cultivos de CMLV durante 24 horas, con el objetivo de mantenerlos en estado quiescente e inactivo, en un medio libre de suero. Para ello, se retiró el medió DMEM con FCS al 10% y se sustituyó en cada pocillo por 0.5 ml de DMEM con BSA a una concentración de 0.1 %.

Para analizar los efectos de la activación de PPARγ sobre el estrés oxidativo y la producción de H_2O_2 se utilizó pioglitazona, a una concentración de 10 μM. Para analizar los efectos del anión superóxido proveniente de la NAD(P)H oxidasa vascular se usó apocinina a una concentración de 30 μM, y como control, para determinar la sensibilidad y especificidad del método, se utilizó catalasa, a una concentración de 1000 U/ml. Tras 18 horas de tratamiento con los fármacos mencionados, se estimularon los cultivos de CMLV con interleuquina-1β (10 ng/ml) durante 24 horas.

A continuación, se añadió en los pocillos DCF-DA disuelto en DMEM suplementado con BSA al 0.1%, a una concentración de 10 μM. Se cubrió la placa para protegerla de la luz y se introdujo en el incubador a 37º C y 5% de CO_2 durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio y se procedió a lavar la placa tres veces con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}. Posteriormente, se añadió en cada pocillo y en oscuridad 500 μl de NaOH 1M filtrada tapando en todo momento la placa con papel de aluminio. La placa protegida de la luz se incubó a temperatura ambiente y en continua agitación durante 30 minutos. A continuación, se transfirieron 200 μl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos opaca, específica para la cuantificación de fluorescencia, y se procedió a leer la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 485 y una longitud de onda de emisión de 530 en un espectrofluorímetro (SPECTRAFluor Plus, Tecan Ibérica, Barcelona, España).

El resto del volumen del extracto celular se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína total, como parámetro para normalizar los datos de fluorescencia adquiridos en cada caso. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo usando el reactivo de Bradford (Sigma). Los datos de fluorescencia para la cuantificación de H_2O_2 y los de absorbancia para obtener la cantidad de proteína, se registraron y procesaron con el software asociado al espectrofotómetro "*XFLUOR-4 v.4.50*" para PC.

9. EXPRESIÓN DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA

Todos los datos se presentan como media ± error estándard (ES) de la media. El número de experimentos en cada caso corresponde al número de ratas utilizadas en el caso de los segmentos aórticos, o de distintos pases de cultivos de CMLV. Las diferencias entre las medias se analizaron con el programa estadístico "*Graphpad Prism v5.0"* mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney cuando se analizaron diferencias entre WKY y SHR (tanto en segmentos aórticos como en cultivos de CMLV), por t de Student pareada cuando se analizó el efecto de la estimulación con IL-1β o de un tratamiento sobre el efecto de esta citoquina en CMLV procedentes de una de las cepas de forma individual, al igual que cuando se analizó el efecto en segmentos aórticos procedentes de una misma rata de la incubación durante 6 horas en KHS. Por último, se utilizó ANOVA de una vía cuando se comparó el efecto de varios tratamientos sobre una situación control dentro de una misma cepa. Se consideró significativo un valor de *p* menor o igual a 0.05.

10. FÁRMACOS Y SOLUCIONES

Todos los fármacos se prepararon en soluciones concentradas (10 o 100 mM) disueltas en agua bidestilada y se almacenaron alicuotadas a -20º C. La solución concentrada de alopurinol se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO).

Los productos utilizados fueron:

- Ácido acético glacial (Panreac)
- Ácido etilendiamintetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido morfolinopropanesulfónico (MOPS) (Sigma)
- Acrilamida (N, N´- Metilenbisacrilamida 40% solución 37,5:1) (BioRad)
- Agarosa (Sigma)
- Albúmina de suero bovina (BSA) (Sigma)
- Angiotensina II (Fluka)
- Apocinina (Fluka)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bromuro de etidio (Sigma)
- Catalasa (Sigma)
- Cloroformo (Merck)
- Colagenasa (Worthington)

- Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceina (Sigma)

- Dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma)

- Dihidroetidio (Molecular Probes)

- Ditiotreitol (DTT) (Sigma)

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

- Dodecil sulfato sódico (SDS) (BioRad)

- EGF (Sigma)

- Etanol (Merck)

- Fenofibrato (Sigma)

- Ficoll (Sigma)

- Formaldehido (Panreac)

- Formamida (Panreac)

- Glucógeno (Sigma)

- Hidrocortisona (Sigma)

- Hidróxido sódico (NaOH) (Panreac)

- Interleuquina 1β recombinante de ratón (Sigma)

- Isopropanol (Merck)

- Leche desnatada (Nestlé)

- Losartán (Merck)

- MCDB 131 (Gibco RL)

- Metanol (Panreac)

- N, N, N´, N´- tetrametil- etilenodiamida (TEMED) (Sigma)

- Ortovanadato sódico (Sigma)

- Persulfato amónico (APS) (Sigma)

- PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (Gibco RL)

- PBS con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Gibco RL)

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sigma)

- Pioglitazona (Lilly Spain y Takeda)

- Reactivo de Bradford (Sigma)

- Suero de ternera fetal (Reactiva)

- Tripsina-EDTA (Gibco RL)

- Tris (hidroximetil)-aminometano) (Tris) (BioRad)

- Trizol (Invitrogen)

- Urea (Sigma)

RESULTADOS

REGULACIÓN POR ANGIOTENSINA II DE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE COX-2 Y PPAR

1. EXPRESIÓN DE COX-2

1.1. EXPRESIÓN DE COX-2 EN SEGMENTOS AÓRTICOS DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

La expresión del ARNm de COX-2 fue mayor en segmentos aórticos recién extraídos (basal) de animales hipertensos (SHR) que en animales normotensos (WKY) (Fig. 26).

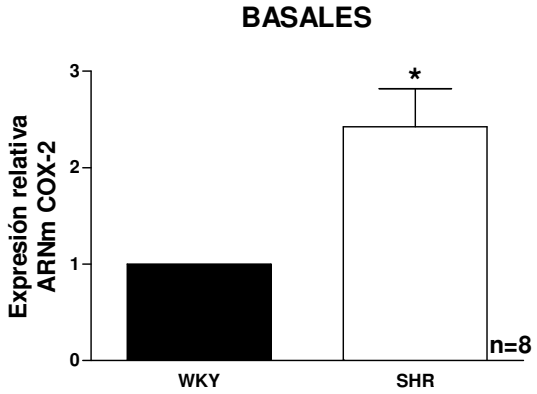


Fig. 26: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en segmentos aórticos recién extraídos de SHR respecto a WKY. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Tras seis horas de incubación de los segmentos en Krebs-Henseleit oxigenado a 37º C, para simular las condiciones de experimentos previos del grupo de reactividad vascular (Álvarez y col., 2005), la expresión del ARNm se incrementó en ambas cepas (Fig. 27). Este incremento fue significativamente mayor en ratas SHR, de modo que en estas condiciones los niveles de ARNm de COX-2 seguían siendo superiores en aorta de ratas SHR cuando se compararon con WKY (Fig. 28).

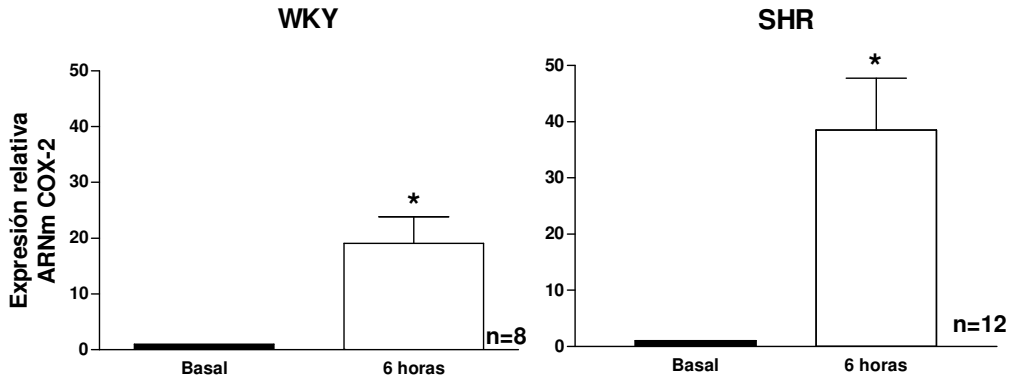


Fig. 27: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en segmentos aórticos de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa del ARNm de los segmentos tras 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit respecto a los niveles de ARNm de segmentos recién extraídos (basal), en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

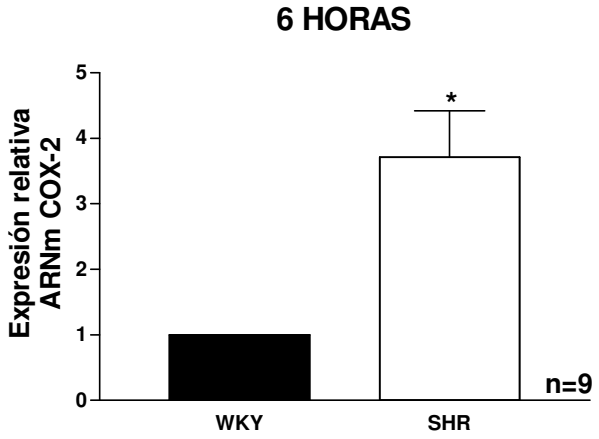


Fig. 28: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en segmentos aórticos de SHR respecto a WKY tras la incubación durante 6 horas en Krebs-Henseleit. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

1.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LOSARTÁN SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE COX-2

En segmentos aórticos recién extraídos de ratas SHR tratadas durante 12 semanas con el antagonista de los receptores AT-1 losartán (15 mg/Kg/día), la expresión del ARNm de COX-2 fue menor que en los segmentos de ratas no tratadas. En el caso de ratas WKY, el tratamiento con losartán no modificó la expresión del ARNm de COX-2 (Fig. 29).

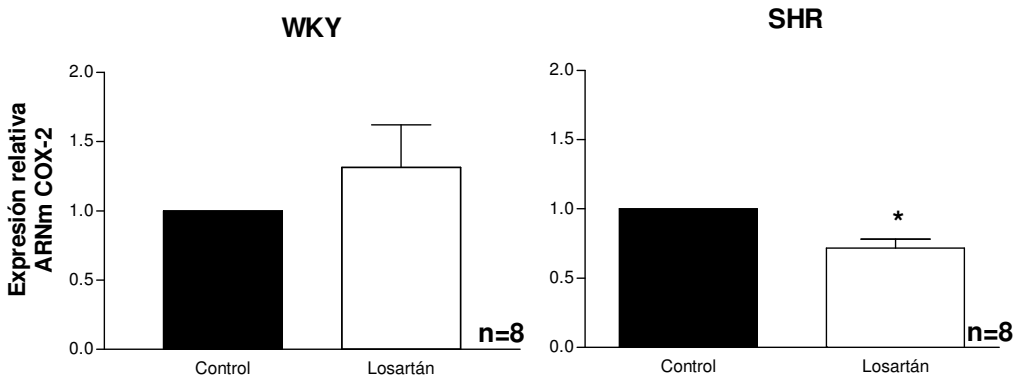


Fig. 29: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en segmentos aórticos recién extraídos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán respecto a segmentos de ambos tipos de animales no tratados (control). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Durante las 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit, la expresión del ARNm de COX-2 también aumentó en los segmentos procedentes de animales tratados con losartán (Fig. 30). Sin embargo, en SHR este incremento fue menor en ratas tratadas que en ratas sin tratar; así, tras las 6 horas de incubación, los niveles de ARNm de COX-2 fueron inferiores en ratas SHR tratadas con losartán que en los animales control, sin encontrarse diferencia alguna en segmentos procedentes de animales normotensos (Fig. 31). No obstante, el tratamiento con losartán no abolió las diferencias entre cepas en la expresión del ARNm de COX-2 observadas tras la incubación durante 6 horas en Krebs-Henseleit (Fig. 32).

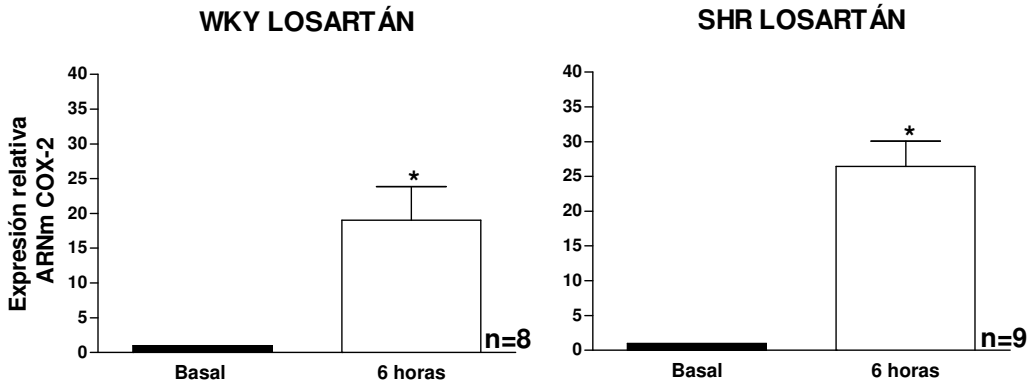


Fig. 30: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en segmentos aórticos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa del ARNm de los segmentos tras 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit respecto a los niveles de ARNm de segmentos recién extraídos (basal), en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

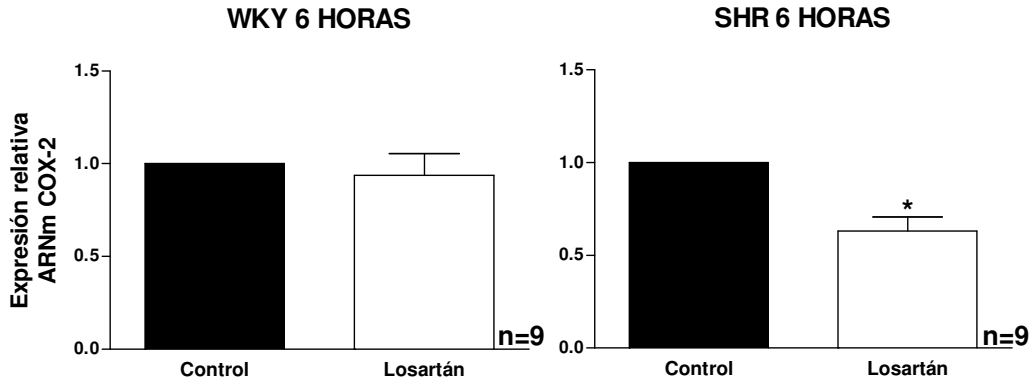


Fig. 31: Expresión relativa del ARNm de COX-2 de segmentos aórticos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán tras la incubación durante 6 horas en Krebs- Henseleit respecto a segmentos procedentes de ratas sin tratar (control). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

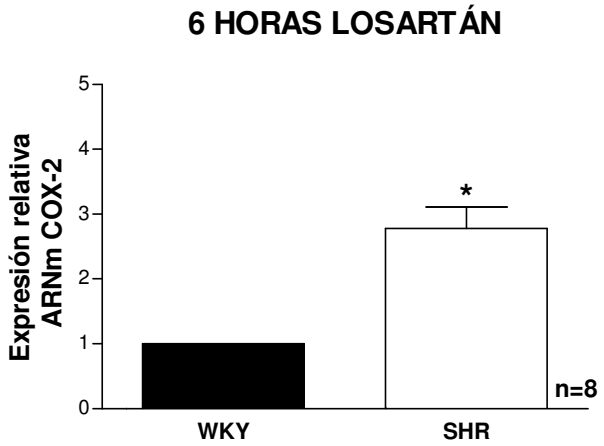


Fig. 32: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en segmentos aórticos de ratas SHR respecto a WKY tratadas con losartán tras 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

1.3. EFECTO DE ANGIOTENSINA II SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN CMLV DE SHR

La estimulación con angiotensina II (0.1 μM) durante 2 horas de CMLV de aorta procedentes de SHR incrementó tanto la expresión del ARNm de COX-2 (Fig. 34) como de la proteína (Fig. 33). El tratamiento con el antagonista específico de los receptores AT-1 losartán (10 μM) inhibió la transcripción de COX-2 inducido por angiotensina II, indicando que el efecto observado está mediado por activación de los receptores de angiotensina AT-1.

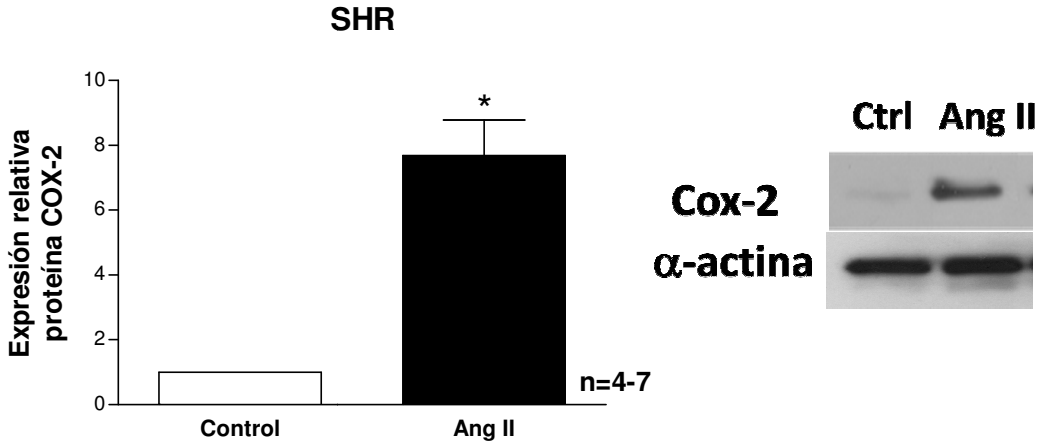


Fig. 33: Efecto de la estimulación durante 2 horas con angiotensina II (Ang II, 0.1 μM) sobre la expresión de la proteína de COX-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de expresión de COX-2 en cultivos no estimulados (control). La expresión se normalizó utilizando α-actina como control de carga. *p< 0.05 vs Ang II por t de Student pareada. Acompañando a la gráfica se muestra un blot representativo.

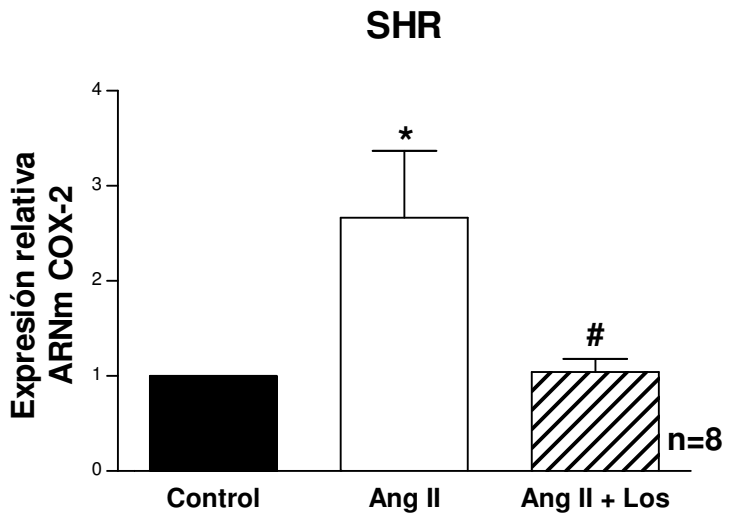


Fig. 34: Efecto de la incubación durante 2 horas con angiotensina II (Ang II, 0.1 μM) en ausencia o presencia de losartán (Los, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos no estimulados (control) en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 vs Control, # p<0.05 vs Ang II por ANOVA de una vía.

1.3.1. Papel de las especies reactivas de oxígeno en la expresión de COX- 2 inducida por angiotensina II

NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa son las principales fuentes de producción de anión superóxido a nivel vascular. Apocinina (30μM) y alopurinol (100 μM), inhibidores respectivos de ambas oxidasas, redujeron la expresión proteica de COX-2 inducida por angiotensina II (Fig. 35). Estos resultados sugieren que la expresión de COX-2 mediada por angiotensina II es dependiente de la producción de anión superóxido.

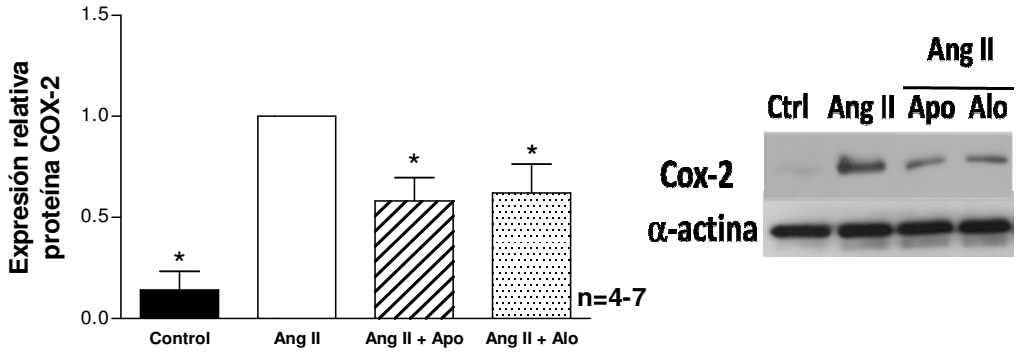


Fig. 35: Efecto del tratamiento con apocinina (Apo, 30 μM) y alopurinol (Alo, 100 μM) sobre la expresión de COX-2 inducida por angiotensina II (0.1 μM, 2 horas) en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto de los niveles de proteína de COX-2 de cultivos estimulados con angiotensina II (Ang II). La expresión se normalizó utilizando α-actina como control de carga. *p< 0.05 vs Ang II por ANOVA de una vía. Acompañando a la gráfica se muestra un blot representativo

Además de inducir la expresión de COX-2 en cultivos procedentes de SHR, la estimulación con angiotensina II (0.1 μM) durante 2 horas también indujo la expresión del ARNm de la subunidad catalítica de la NAD(P)H oxidasa, NOX-1 (Fig. 36). El tratamiento con el antagonista específico de los receptores AT-1 losartán (10 μM) redujo el incremento en la expresión de NOX-1 inducido por angiotensina II, indicando que este efecto es también mediado a través de los receptores de angiotensina AT-1.

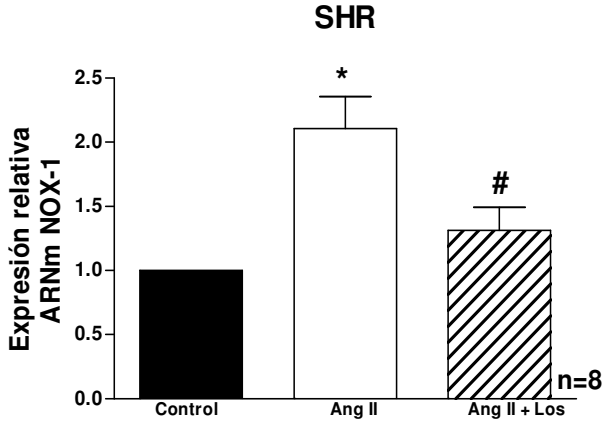


Fig. 36: Efecto de la incubación durante 2 horas con angiotensina II (Ang II, 0.1 μM) en ausencia o presencia de losartán (Los, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de NOX-1 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos no estimulados (control) en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 vs control y #p<0.05 vs Ang II por ANOVA de una vía.

2. EXPRESIÓN DE PPARα EN SEGMENTOS AÓRTICOS DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

La expresión del ARNm de PPARα fue similar en segmentos aórticos recién extraídos (basales) procedentes de ambas cepas (Fig. 37).

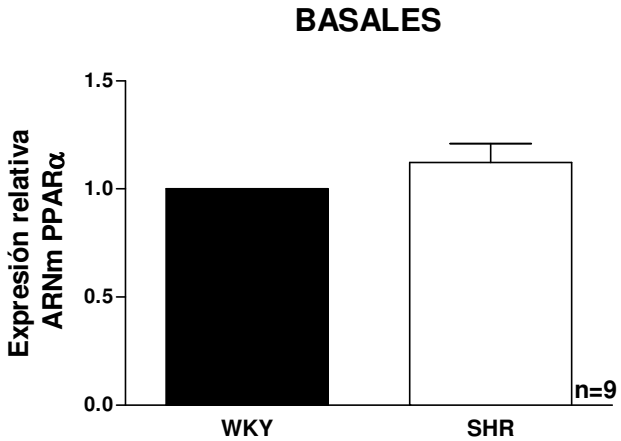


Fig. 37: Expresión relativa del ARNm de PPARα en segmentos aórticos recién extraídos de SHR respecto a WKY. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

Tras la incubación durante 6 horas en Krebs Henseleit, se produjo un descenso en la expresión de PPARα en segmentos procedentes de ambas cepas (Fig. 38). Esta disminución fue similar en WKY y SHR, de modo que tras 6 horas de incubación los niveles de ARNm de PPARα seguían siendo similares en segmentos de las dos cepas (Fig. 39).

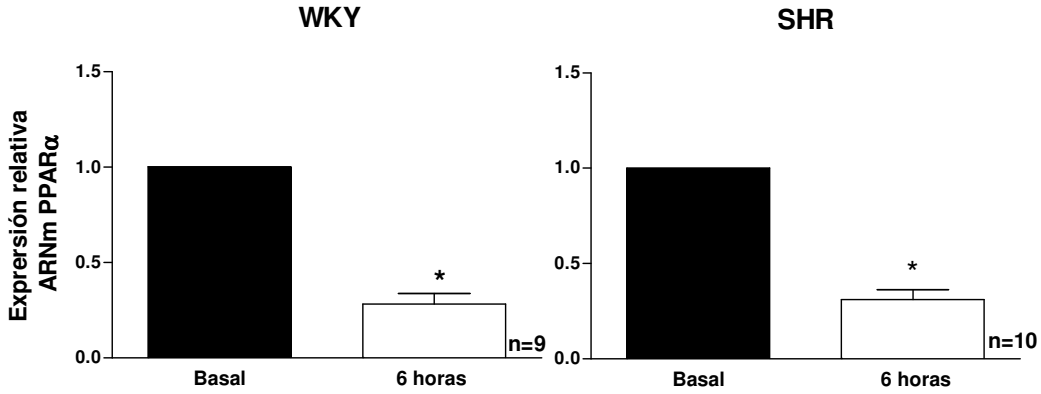


Fig. 38: Expresión del ARNm de PPARα en segmentos aórticos de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa del ARNm de los segmentos tras 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit respecto a los niveles de ARNm de segmentos recién extraídos (basal) en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

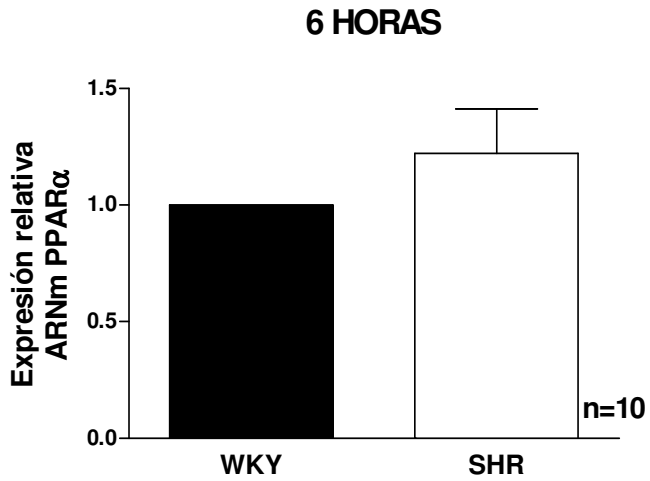


Fig. 39: Expresión relativa del ARNm de PPARα en segmentos aórticos de SHR respecto a WKY tras la incubación durante 6 horas en Krebs-Henseleit. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

3. EXPRESIÓN DE PPARγ EN SEGMENTOS AÓRTICOS DE RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS

La expresión del ARNm de PPARγ en segmentos aórticos en situación basal fue menor en ratas SHR que en WKY (Fig. 40).

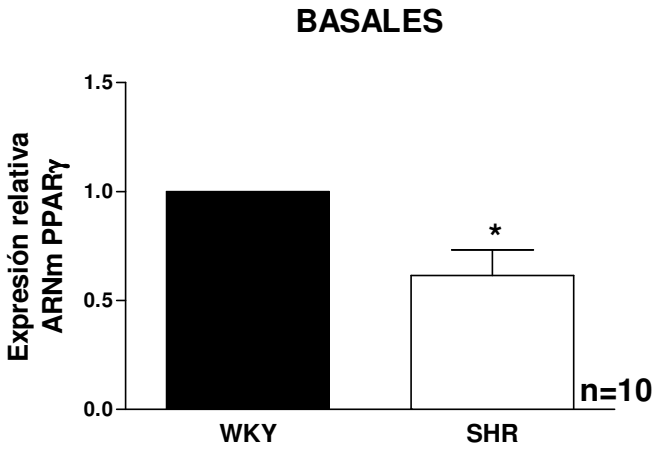


Fig. 40: Expresión relativa del ARNm de PPARγ en segmentos aórticos recién extraídos de SHR respecto a WKY. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Tras la incubación durante 6 horas en Krebs Henseleit, se produjo un descenso en la expresión de PPARγ en segmentos procedentes de ambas cepas (Fig. 41). En estas condiciones, los niveles de ARNm de PPARγ continuaron siendo inferiores en ratas SHR con respecto a ratas normotensas (Fig. 42).

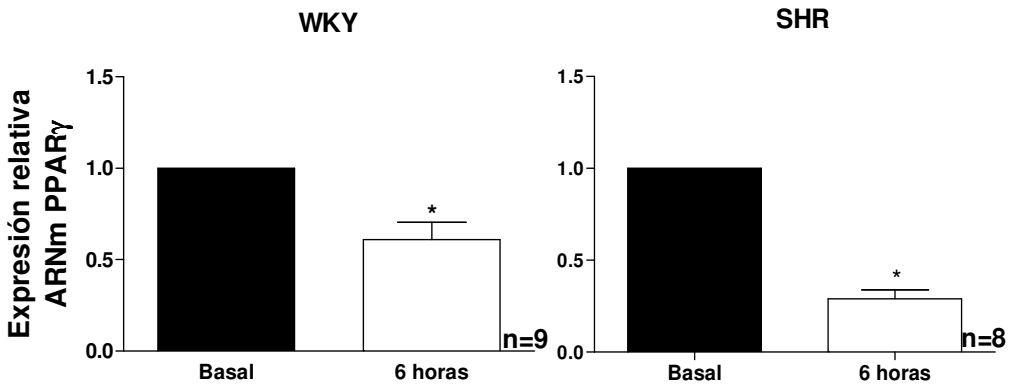


Fig. 41: Expresión del ARNm de PPARγ en segmentos aórticos de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión del ARNm de los segmentos tras 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit respecto a los niveles de ARNm de segmentos recién extraídos (basal), en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

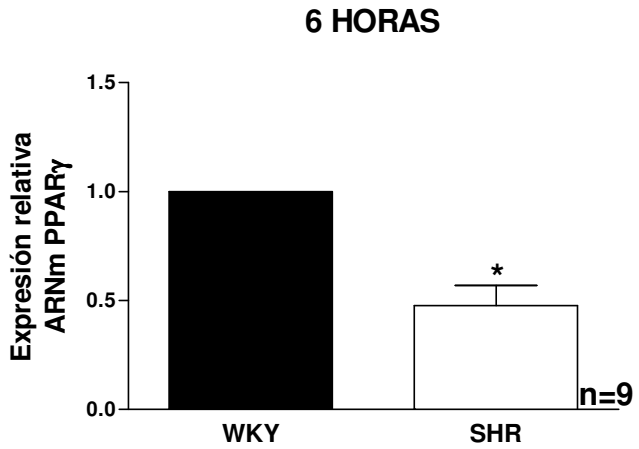


Fig. 42: Expresión del ARNm de PPARγ en segmentos aórticos de SHR respecto a WKY tras la incubación durante 6 horas en Krebs-Henseleit. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

3.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON LOSARTÁN SOBRE LA EXPRESIÓN DE PPARγ

El tratamiento de los animales con losartán incrementó el ARNm de PPARγ en segmentos aórticos de SHR en condiciones basales, sin observarse modificaciones en segmentos de WKY (Fig. 43).

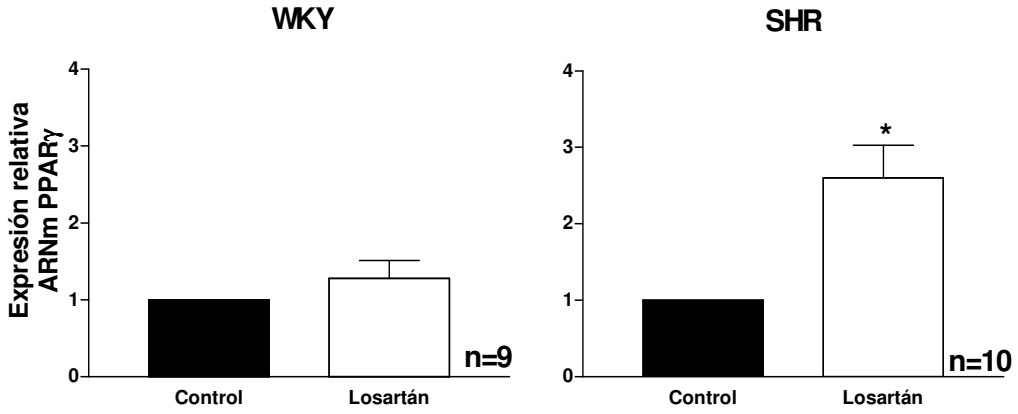


Fig. 43: Expresión relativa del ARNm de PPARγ en segmentos aórticos recién extraídos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán respecto a segmentos de ambos tipos de animales no tratados (control). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Tras la incubación de los segmentos aórticos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán durante 6 horas en Krebs-Henseleit, se observó una disminución en la expresión del ARNm de PPARγ en ambos tipos de animales, de forma similar a lo observado en ratas sin tratar (Fig. 44).

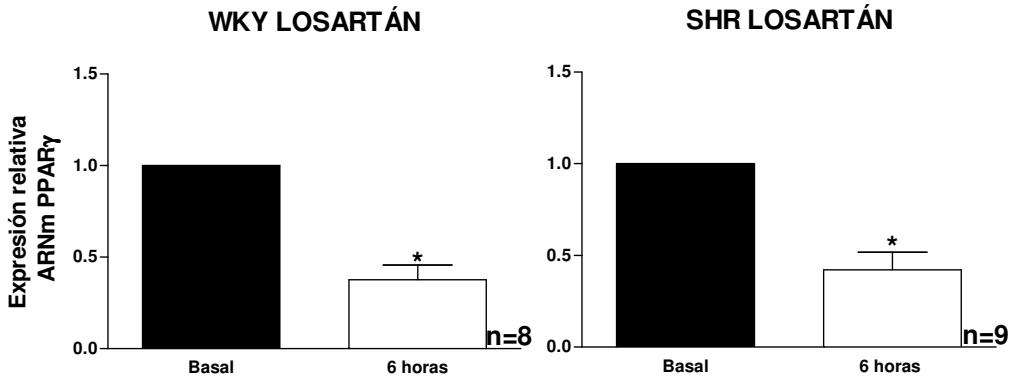


Fig. 44: Expresión del ARNm de PPARγ en segmentos aórticos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión del ARNm de los segmentos tras 6 horas de incubación en Krebs-Henseleit respecto a los niveles de ARNm de segmentos recién extraídos (basal), en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

Cuando se compararon los niveles de ARNm se observó que, en estas condiciones, dichos niveles fueron menores en segmentos de ratas WKY tratadas con losartán que en segmentos de ratas sin tratar (control). Sin embargo, en el caso de las ratas SHR, la expresión fue mayor tras el tratamiento con losartán (Fig. 45). Como consecuencia, los niveles de ARNm de PPARγ fueron superiores en ratas SHR que en WKY tratadas con losartán (Fig. 46), a diferencia de lo que hemos descrito anteriormente que ocurría en ratas sin tratar.

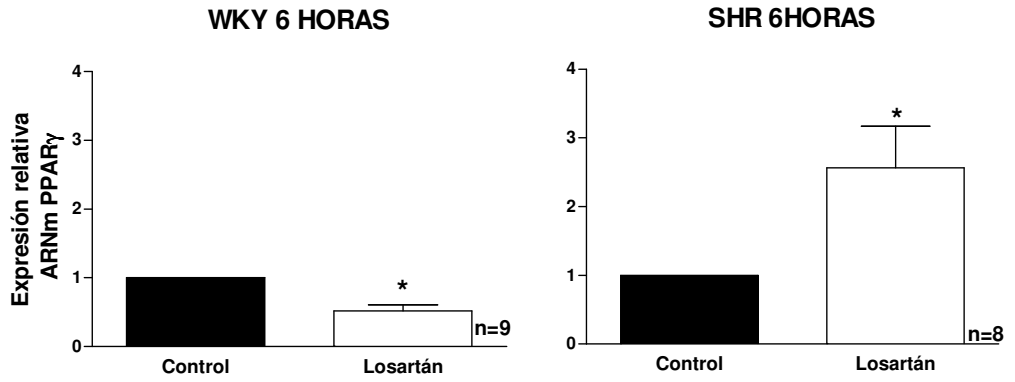


Fig. 45: Expresión relativa del ARNm de PPARγ de segmentos aórticos de ratas WKY y SHR tratadas con losartán tras la incubación durante 6 horas en Krebs-Henseleit respecto a segmentos procedentes de ratas sin tratar (control). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

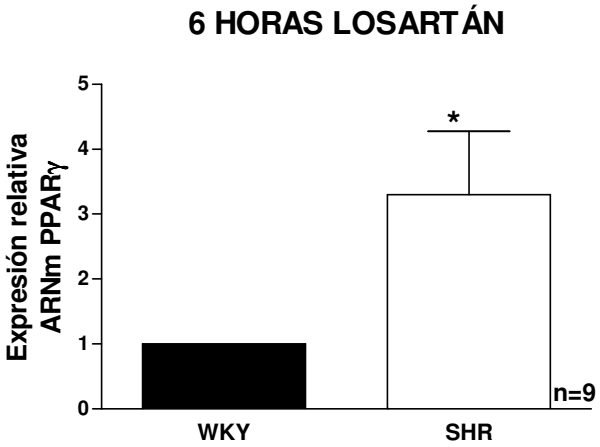


Fig. 46: Expresión relativa del ARNm de PPARγ de SHR respecto a WKY en segmentos aórticos de ratas tratadas con losartán tras la incubación durante 6 horas en Krebs-Henseleit. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Withney.

REGULACIÓN POR PPAR DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1β

4. EXPRESIÓN DE COX-2 EN CULTIVOS DE CMLV

En condiciones basales no se encontraron diferencias en la expresión del ARNm de COX-2 entre cultivos procedentes de aorta de animales hipertensos y normotensos (Fig. 47).

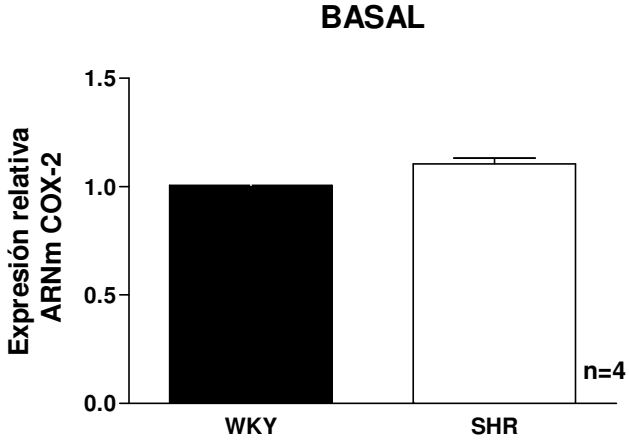


Fig. 47: Expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de SHR respecto a WKY. La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

4.1. EFECTO DE IL-1β SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN CULTIVOS DE CMLV DE RATAS SHR Y WKY

Tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas, la expresión del ARNm de COX-2 se incrementó en cultivos procedentes de ambas cepas, siendo este incremento superior en CMLV de SHR (Fig. 48), de modo que los niveles de ARNm de COX-2 al finalizar el periodo de estimulación fueron superiores en cultivos de SHR comparados con los procedentes de WKY (Fig. 49).

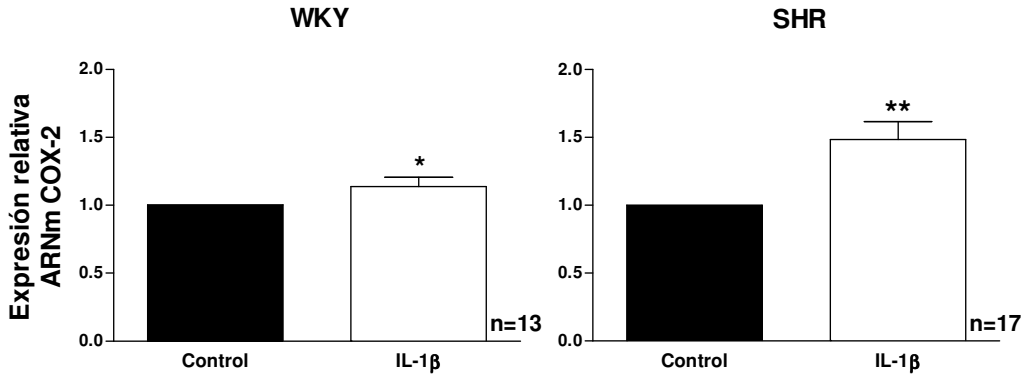


Fig. 48: Efecto del tratamiento durante 24 h con IL-1β (10 ng/ml) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV procedentes de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos en situación control, en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05, ** p< 0.01 por t de Student pareada.

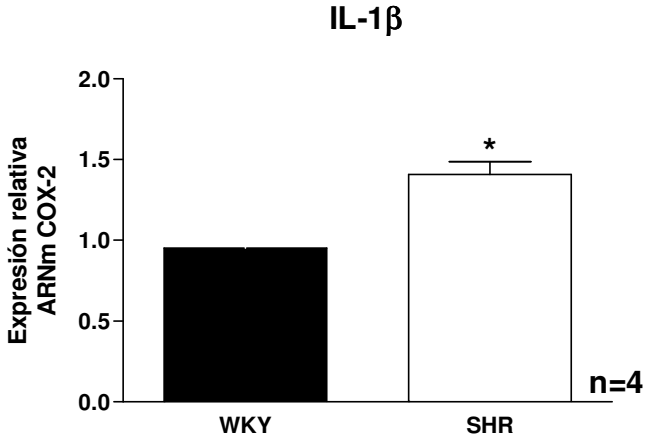


Fig. 49: Expresión relativa del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV procedentes de aorta de SHR respecto a WKY tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Withney.

4.2. PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA TRANSCRIPCIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1β EN CMLV

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

La principal fuente vascular de producción de anión superóxido es la NADP(H) oxidasa. La expresión basal del ARNm de su subunidad catalítica, NOX-1, fue mayor en cultivos de CMLV procedentes de aorta de ratas SHR que en los procedentes de ratas WKY (Fig. 50).

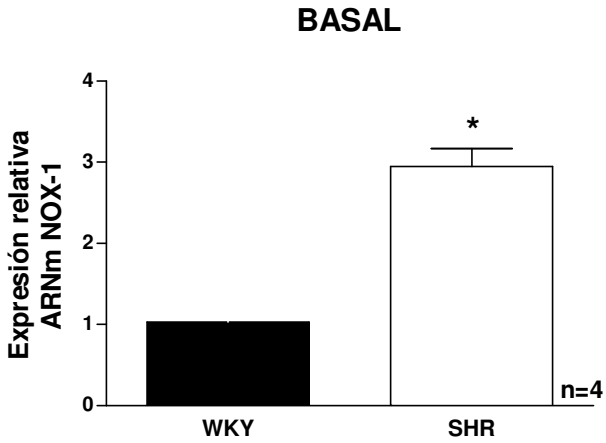


Fig. 50: Expresión del ARNm de NOX-1 en cultivos de CMLV procedentes de aorta de SHR respecto a cultivos procedentes de WKY. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

El tratamiento con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas indujo la expresión del ARNm de NOX-1 en cultivos de CMLV procedentes de ambas cepas (Fig. 51); tras la estimulación, la expresión de NOX-1 siguió siendo superior en cultivos de CMLV procedentes de SHR que de WKY (Fig. 52).

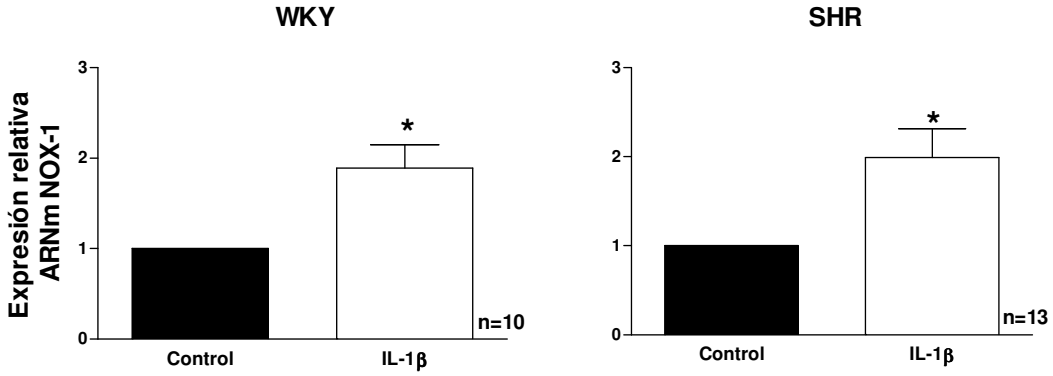


Fig. 51: Efecto del tratamiento durante 24 h con IL-1β (10 ng/ml) sobre la expresión del ARNm de NOX-1 en cultivos de CMLV procedentes de aorta de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos control no estimulados, en cada caso. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

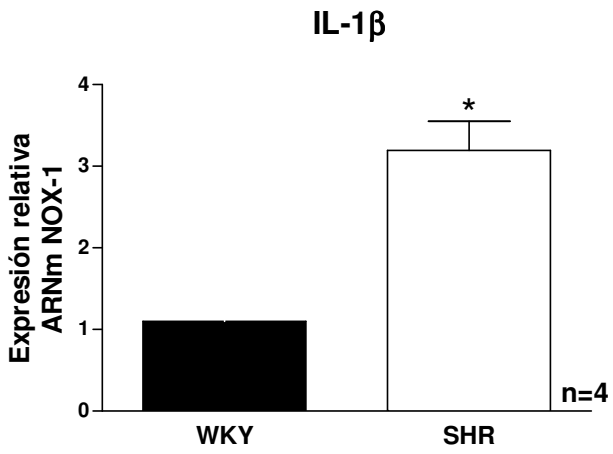


Fig. 52: Expresión relativa del ARNm de NOX-1 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR respecto a WKY tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas. La expresión se normalizó utilizando Ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

El tratamiento con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa apocinina (30 μM) no modificó la expresión del ARNm de NOX-1 inducida por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en ninguna de las dos cepas, descartando la posibilidad de que el propio estrés oxidativo generado participase en la inducción de esta enzima (Fig. 53).

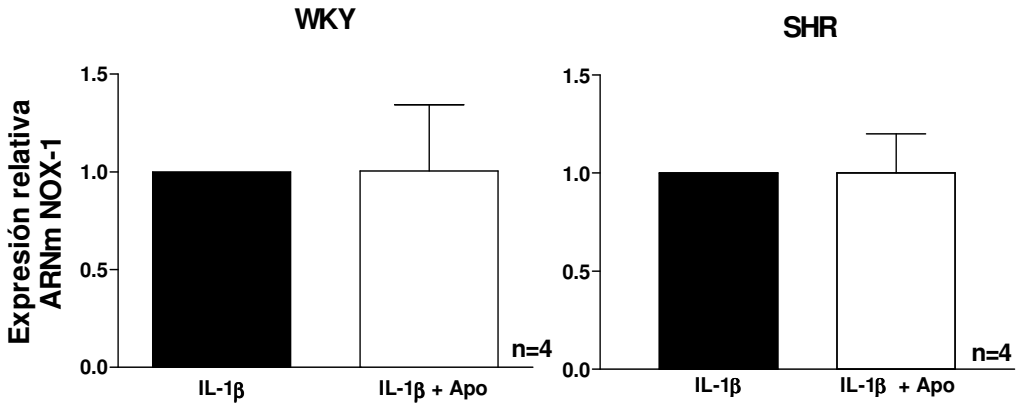
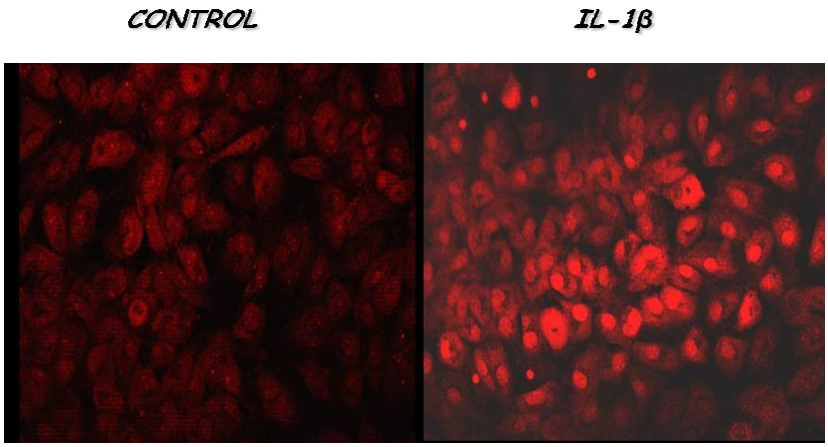


Fig. 53: Efecto del tratamiento con apocinina (Apo, 30 μM) sobre la expresión del ARNm de NOX-1 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se presentan como el valor medio ± ES.

4.2.2. Efecto de IL-1β sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$

El tratamiento de los cultivos de CMLV de SHR con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas incrementó la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 54).



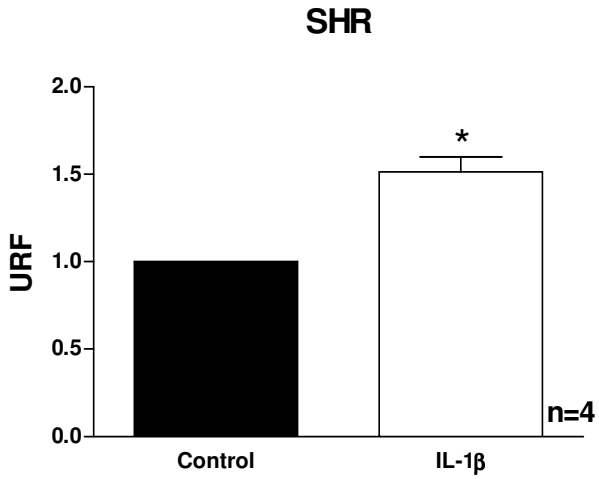


Fig. 54: Efecto de el tratamiento con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas sobre la producción de anión superóxido en cultivos de CMLV procedentes de SHR, cuantificado por el método del dihidroetidio. Los paneles superiores muestran microfotografías representativas de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en ausencia de estímulo (control) y tras el tratamiento con IL-1β. Las imagenes se capturaron con un microscopio confocal (objetivo 40X). Los resultados (media ± ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF). *p< 0.05 por t de Student pareada.

4.2.3. Efecto del tratamiento con apocinina sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β

El tratamiento de los cultivos de CMLV procedentes de aorta de ratas SHR con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa apocinina (30 μM) redujo los niveles de ARNm de COX-2 inducidos por IL-1β (Fig. 55). Este resultado sugiere la relación entre el incremento en la transcripción de COX-2 inducido por IL-1β y la producción de anión superóxido por la NAD(P)H oxidasa en estas células. En el caso de cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas WKY, el tratamiento con apocinina no modificó la expresión del ARNm de COX-2 (Fig. 55).

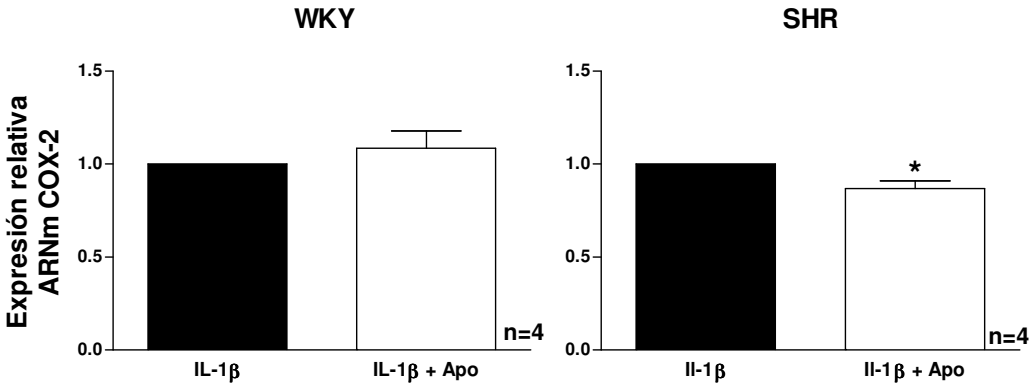


Fig. 55: Efecto del tratamiento con apocinina (Apo, 30 μM) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

4.2.4. Efecto de IL-1β sobre la producción de H_2O_2

El tratamiento con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas de los cultivos de CMLV procedentes de SHR incrementó la producción de H_2O_2 (Fig. 56). Además, el tratamiento con apocinina redujo la producción de H_2O_2 en cultivos de CMLV procedentes de SHR estimulados con IL-1β. Este resultado indica que el H_2O_2 inducido por la IL-1β procede, al menos en parte, del incremento en la producción de anión superóxido producido por la activación de la NAD(P)H oxidasa. La especificidad del método se determinó, mediante la incubación con catalasa (1000 U/ml), que abolió por completo el incremento en la producción de H_2O_2 inducido por IL-1β.

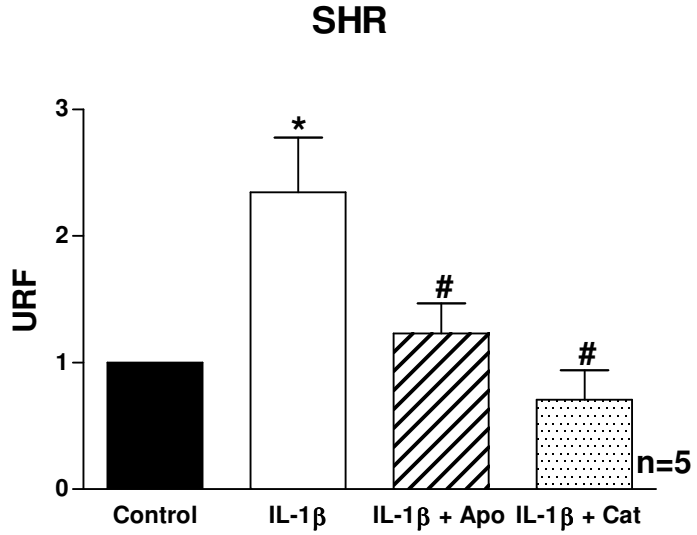


Fig. 56: Efecto del tratamiento con apocinina (Apo, 30 μM) sobre el incremento en la producción de H_2O_2 inducido por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en cultivos de CMLV procedentes de ratas SHR cuantificado por el método de la diclorofluoresceina. Los resultados (media ± ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se utilizó el tratamiento con catalasa (Cat, 1000 U/ml) como control del experimento. *p<0.05 vs control; # p<0.01 vs IL-1β por ANOVA de una vía.

4.2.5. Efecto del tratamiento con catalasa sobre la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β

El tratamiento con catalasa (1000 U/ml) redujo la expresión del ARNm de COX-2 inducida por IL-1β (10 ng/ml) en cultivos de CMLV procedentes de SHR, confirmando la participación del H_2O_2 en la activación de la transcripción de COX-2 inducida por esta citoquina (Fig. 57).

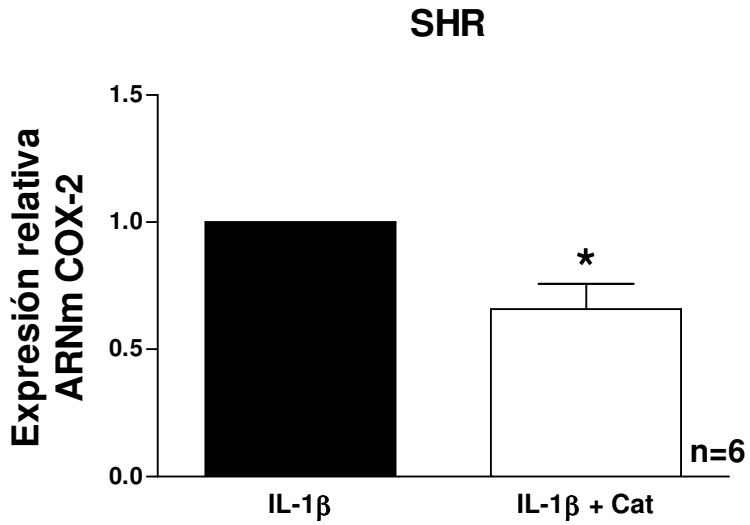


Fig. 57: Efecto del tratamiento con catalasa (Cat, 1000 U/ml) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó usando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

4.2.6. Efecto del H_2O_2 sobre la expresión de COX-2

La incubación con H_2O_2 (50 μM) durante 90 minutos indujo la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de SHR. El tratamiento con catalasa (1000 U/ml) redujo los niveles de COX-2 inducidos por el H_2O_2, confirmando la especificidad del efecto del H_2O_2 sobre la expresión de COX-2 (Fig. 58).

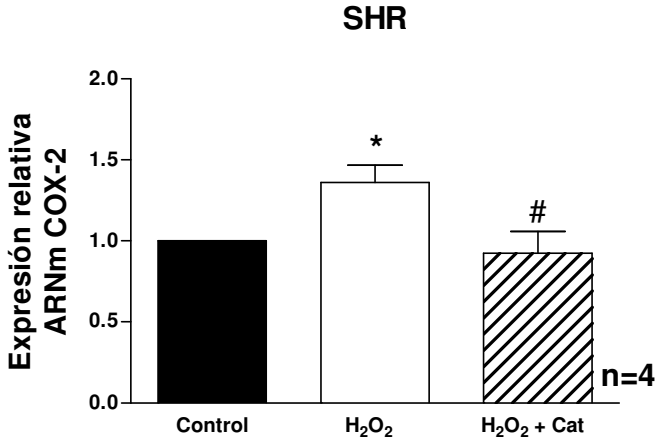


Fig. 58: Efecto del H_2O_2 (50 μM, 90 minutos) en ausencia y en presencia de catalasa (Cat, 1000 U/ml) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) se expresan respecto a los niveles de ARNm de cultivos no estimulados (control). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 vs Control; #p<0.05 vs H_2O_2 por ANOVA de una vía.

4.3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPARγ SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE COX-2

4.3.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β

El tratamiento con el activador PPARγ pioglitazona (10 μM) no modificó la expresión basal de COX-2 en ninguna de las dos cepas (Fig. 59). Sin embargo, la activación de PPARγ redujo la expresión del ARNm de COX-2 inducida por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en CMLVs procedentes de SHR, sugiriendo la participación de PPARγ en la regulación de la expresión de COX-2 inducida por esta citoquina. En el caso de CMLV de ratas WKY estimuladas con IL-1β, el tratamiento con pioglitazona no modificó la expresión del ARNm de COX-2, indicando que la regulación de la transcripción de COX-2 por PPARγ puede estar asociada con la hipertensión (Fig. 60).

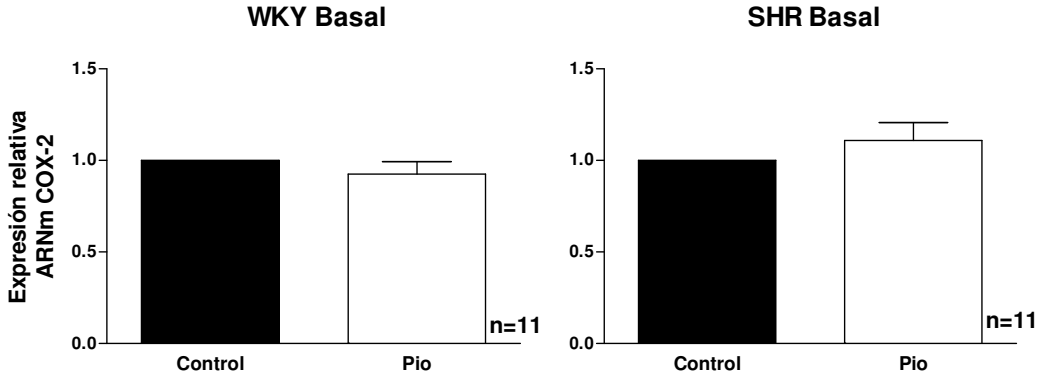


Fig. 59: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la expresión basal del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

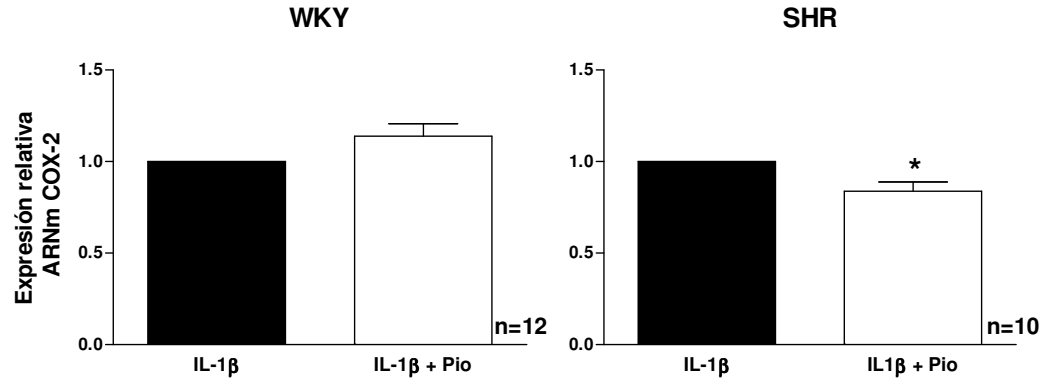


Fig. 60: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *$p < 0.05$ por t de Student pareada.

4.3.2. Efecto de la transfección con siRNA de PPARγ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β

La utilización de un siRNA específico para PPARγ redujo la expresión génica del mismo en aproximadamente un 75% (Fig. 61). En estas condiciones se incrementó la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV de SHR, confirmando la regulación negativa que ejercen los niveles de expresión de PPARγ sobre la transcripción de COX-2 en esta cepa (Fig. 61). La transfección con un ARN interferente control, carente de homología con cualquier ARNm celular, no modificó significativamente la expresión de COX-2, confirmando la especificidad del efecto.

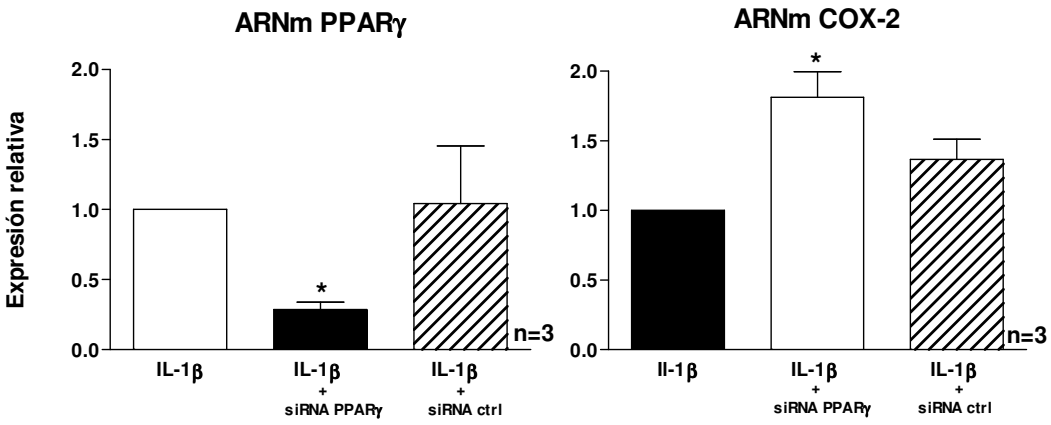


Fig. 61: Expresión del ARNm de PPARγ y COX-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR estimuladas con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en presencia de siRNA específico para PPARγ (5 nM) y de un siRNA sin homología con ningún ARN (siRNActrl, 5 nM), como control de interferencia. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa con respecto a los niveles de ARNm de cultivos estimulados con IL-1β. La expresión se normalizó utilizando Ciclofilina D como control endógeno. *p< 0.05 por ANOVA de una vía.

4.4. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPARα SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE COX-2

El tratamiento con el activador PPARα fenofibrato (10 μM) no modificó la expresión basal de COX-2 en CMLV de ninguna de las dos cepas (Fig. 62), de manera similar a lo ocurrido tras el tratamiento con pioglitazona.

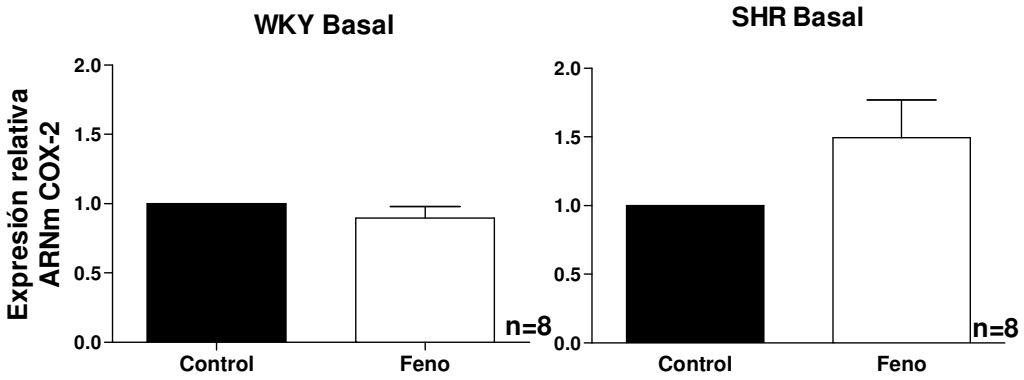


Fig. 62: Efecto del fenofibrato (Feno, 10 μM) sobre la expresión basal del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de SHR y WKY. La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

En cultivos procedentes de ratas SHR, fenofibrato (10 μM) no modificó la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β, e incluso incrementó dichos niveles en cultivos procedentes de ratas WKY (Fig. 63).

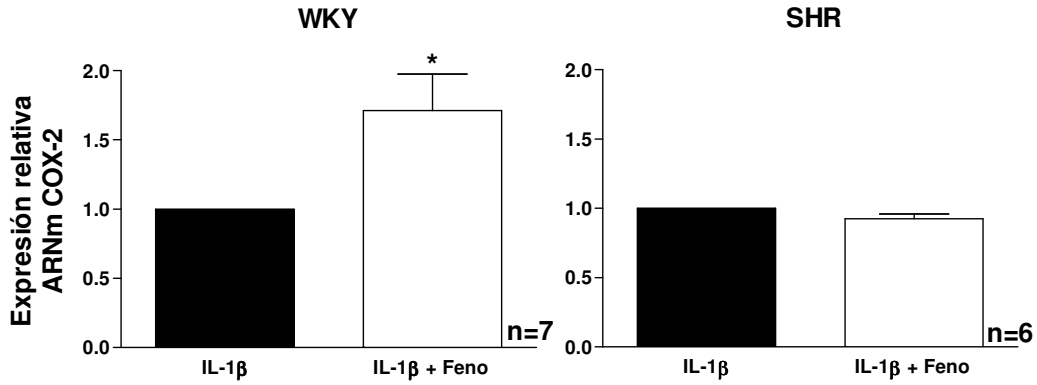


Fig. 63: Efecto de fenofibrato (Feno, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de COX-2 en cultivos de CMLV de WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas usando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

En cultivos de la línea celular endotelial microvascular humana HMEC-1, el tratamiento con fenofibrato (10 μM) incrementó la expresión basal de COX-2 (Fig. 64).

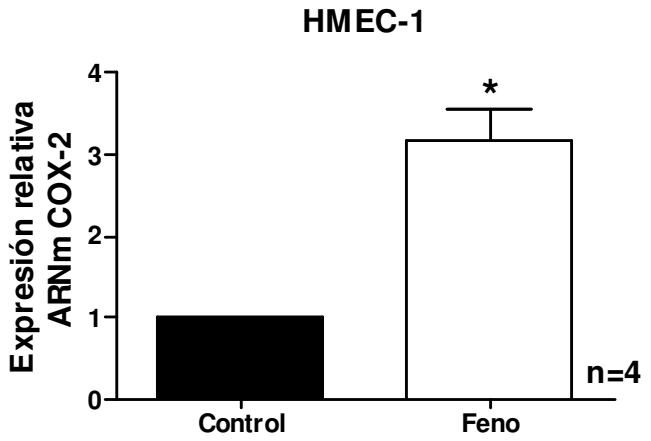


Fig. 64: Efecto de fenofibrato (Feno, 10 μM) sobre la expresión basal del ARNm de COX-2 en cultivos de la línea celular endotelial microvascular humana HMEC-1. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

4.4.1. Efecto de la activación de los receptores PPARα sobre la transcripción de endotelina-1 en cultivos de HMEC-1

El tratamiento con fenofibrato (10 μM) redujo la transcripción de endotelina-1 en cultivos de la línea celular HMEC-1 (Fig. 65), a diferencia de lo ocurrido con los niveles basales del ARNm de COX-2, sugiriendo que en arterias de resistencia el efecto antiinflamatorio del fenofibrato podría ejercerse a través de la reducción en los niveles de expresión de endotelina-1.

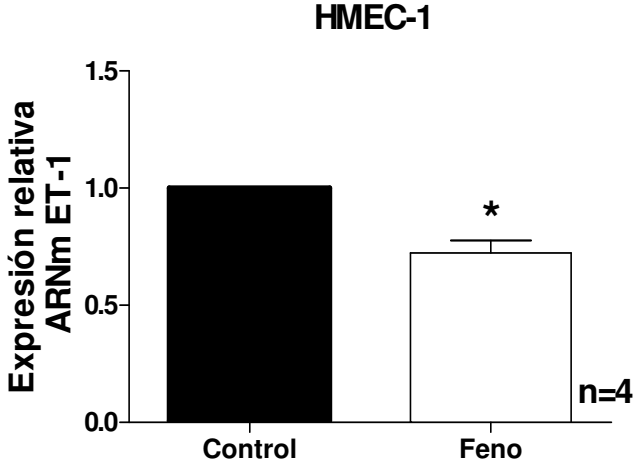


Fig. 65: Efecto de fenofibrato (Feno, 10 μM) sobre la expresión basal del ARNm de endotelina-1 (ET-1) en cultivos de HMEC-1. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

5. EXPRESIÓN DE PPARγ EN CULTIVOS DE CMLV

5.1. EFECTO DE IL-1β SOBRE LA EXPRESIÓN DE PPARγ

En situación basal, la expresión de PPARγ fue mayor en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR que en cultivos procedentes de WKY (Fig. 66). El tratamiento con 10 ng/ml de IL-1β durante 24 horas incrementó la transcripción de PPARγ sólo en cultivos de CMLV procedentes de SHR (Fig. 67). Así, tras la incubación con IL-1β, los niveles de ARNm de PPARγ fueron también mayores en CMLV procedentes de ratas SHR que en los de WKY (Fig. 68).

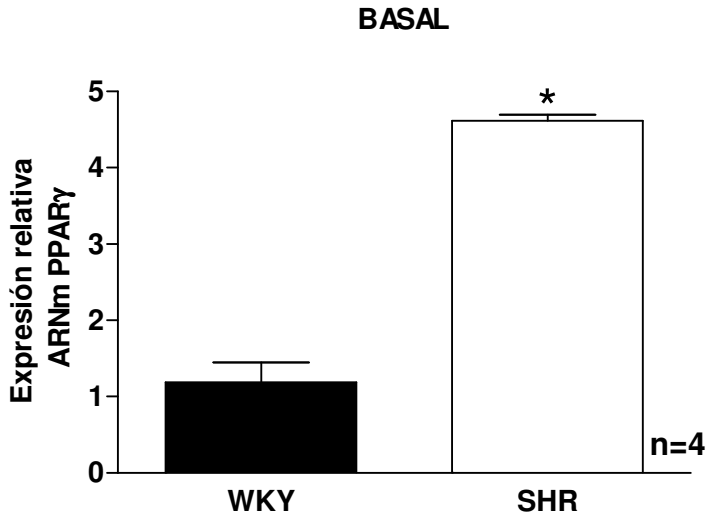


Fig. 66: Expresión del ARNm de PPARγ en cultivos de CMLV de SHR respecto a WKY. La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p<0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

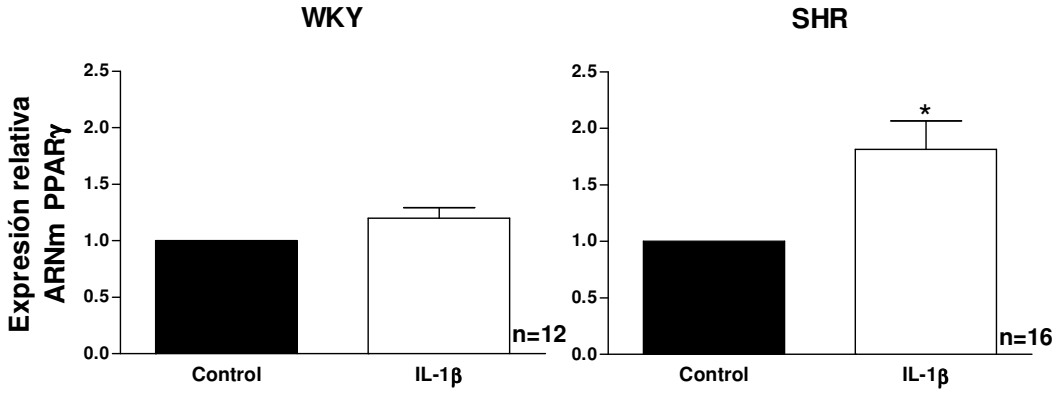


Fig. 67: Efecto del tratamiento durante 24 horas con IL-1β (10 ng/ml) sobre la expresión del ARNm de PPARγ en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa del ARNm de los cultivos estimulados con IL-1β respecto a los niveles de ARNm de cultivos en situación control, en cada caso. La expresión se normalizó para cada cultivo utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 por t de Student pareada.

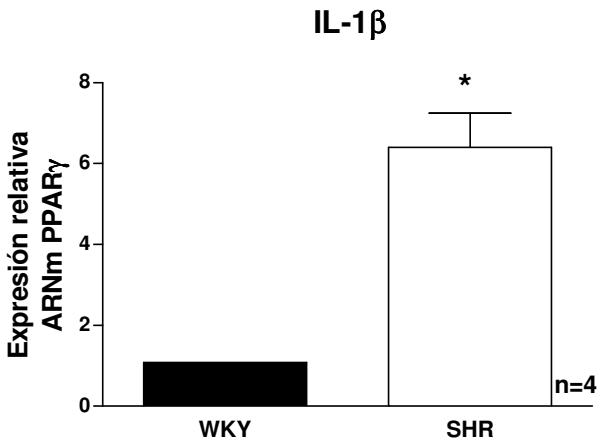


Fig. 68: Expresión relativa del ARNm de PPARγ en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR respecto a WKY tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas. La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por el test no paramétrico Mann-Whitney.

5.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON PIOGLITAZONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE PPARγ INDUCIDA POR IL-1β

El activador de PPARγ pioglitazona (10 μM) incrementó la expresión del ARNm de PPARγ inducida por IL-1β en cultivos de CMLV procedentes de aorta de ratas SHR; sin embargo, no modificó la expresión de PPARγ en cultivos procedentes de animales normotensos (Fig. 69), indicando que la activación del receptor modifica su propia expresión.

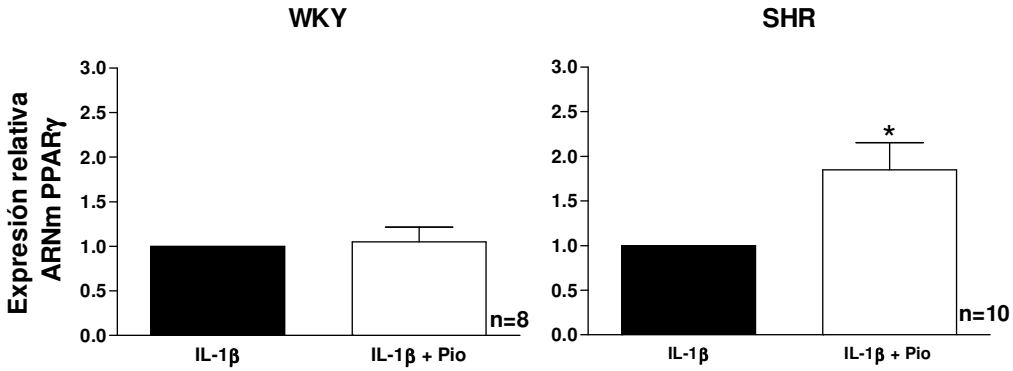


Fig. 69: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de PPARγ en CMLV de ratas WKY y SHR estimuladas con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 por t de Student pareada.

5.3. EFECTO DE PPARγ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE $O_2^{\cdot-}$ EN CULTIVOS DE CMLV DE SHR

5.3.1. Efecto del tratamiento con pioglitazona sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1β

El tratamiento con el activador PPARγ pioglitazona (10 μM) redujo la expresión del ARNm de NOX-1 inducida por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) sólo en CMLVs de aorta procedentes de ratas SHR (Fig. 70).

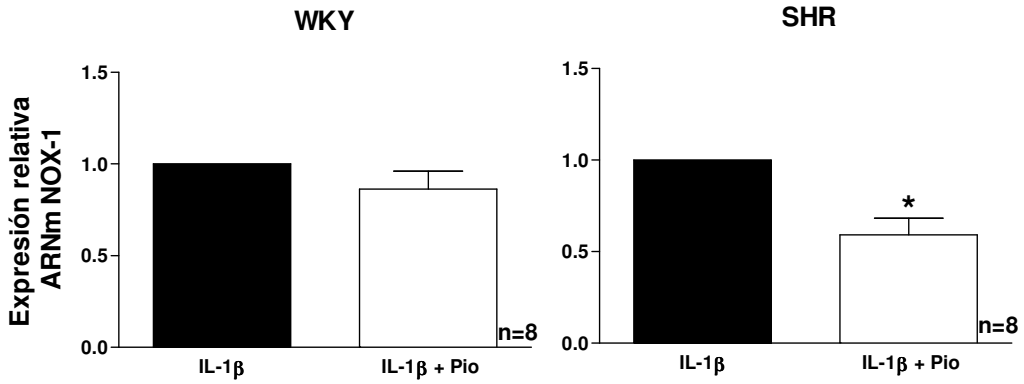


Fig. 70: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de NOX-1 en CMLV de ratas WKY y SHR estimuladas con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por t de Student pareada.

5.3.2. Efecto de la transfección con siRNA de PPARγ sobre la expresión de NOX-1 inducida por IL-1β

La reducción en la expresión de ARNm de PPARγ tras transfectar con un siRNA (5 nM) específico para PPARγ incrementó la transcripción de NOX-1 inducida por IL-1β en CMLV de SHR, sugiriendo que la activación endógena de PPARγ regula negativamente la transcripción de NOX-1 (Fig. 71).

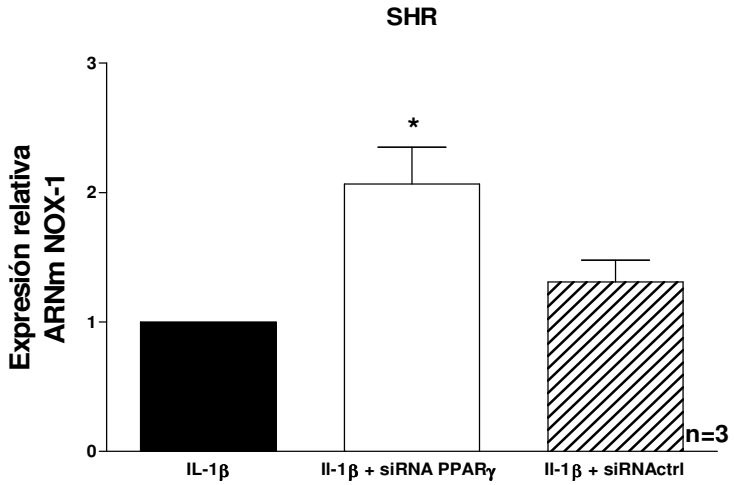


Fig. **71**: Expresión del ARNm de NOX-1 en CMLV de ratas SHR estimuladas con IL-1β (10 ng/ ml, 24 horas) en presencia de siRNA para PPARγ (5 nM) y de un siRNA sin homología con ningún ARN (siRNActrl, 5 nM), como control de interferencia. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa con respecto a los niveles de ARNm de cultivos estimulados con IL-1β en cada caso. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno.*p < 0.05 por ANOVA de una vía.

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

El tratamiento con el activador PPARγ pioglitazona (10 μM) redujo la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLV procedentes de SHR estimuladas con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) (Fig. 72). Como se comentó previamente, la transcripción de COX-2 es dependiente de los niveles de $O_2^{\cdot-}$, por lo tanto, la reducción en la generación de esta especie reactiva de oxígeno por pioglitazona podría explicar la regulación negativa de la expresión de COX-2 ejercida por la activación de PPARγ en CMLV de SHR.

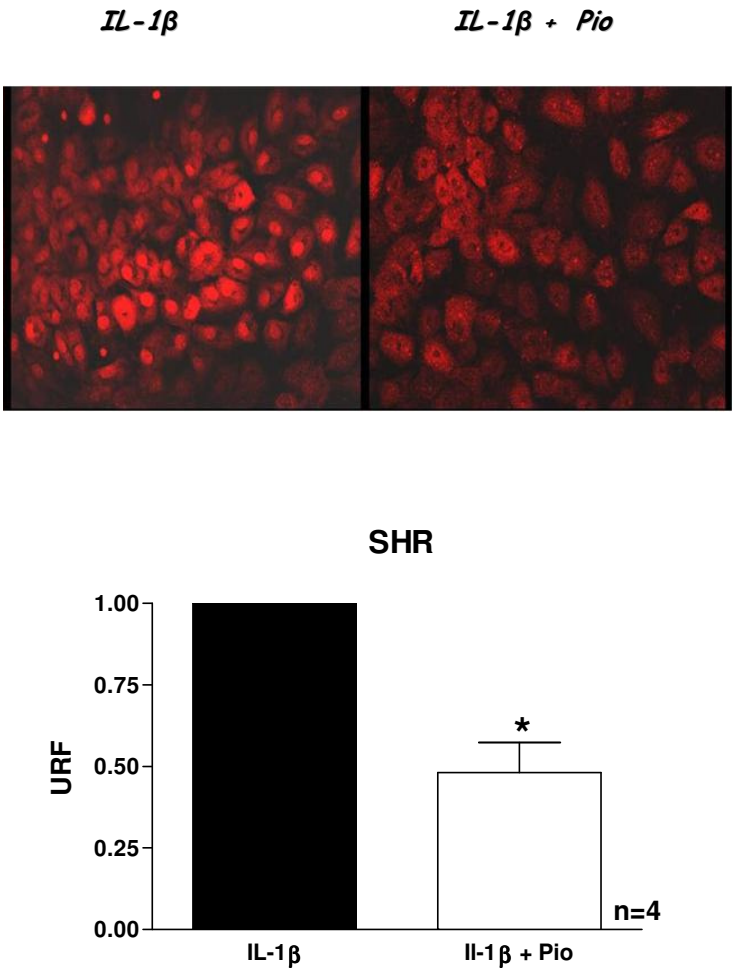


Fig. 72: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la producción de anión superóxido inducida por IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas determinado por el método del dihidroetidio, en cultivos de CMLV procedentes de SHR. Los paneles superiores muestran microfotografías representativas de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLV con y sin tratamiento con pioglitazona. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal (objetivo 40X). Los resultados (media ± ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF). *p< 0.05 por t de Student pareada.

5.4. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPARγ SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS SODs

5.4.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de SOD-1 y SOD-2 en CMLV de ratas normotensas e hipertensas. Papel del $O_2^{\cdot-}$

La superóxido dismutasa-1 (SOD-1) es una enzima con función antioxidante que se diferencia de las otras dos isoformas por su localización citoplasmática y por presentar un núcleo de Cu/Zn fundamental para su actividad antioxidante. Por su parte, la SOD-2 presenta localización mitocondrial y un núcleo Mn^{2+}, ejerciendo su actividad detoxificante a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial. Ambas SODs son capaces de eliminar el anión superóxido reduciendo el estrés oxidativo, pero generando, a su vez, otra especie reactiva de oxígeno como es el H_2O_2. Los niveles de expresión del ARNm de SOD-1 en situación basal fueron menores en cultivos procedentes de aorta de ratas SHR que en los de WKY. Sin embargo, no hubo diferencias en los niveles de ARNm de SOD-2 entre CMLV de ambas cepas (Fig. 73).

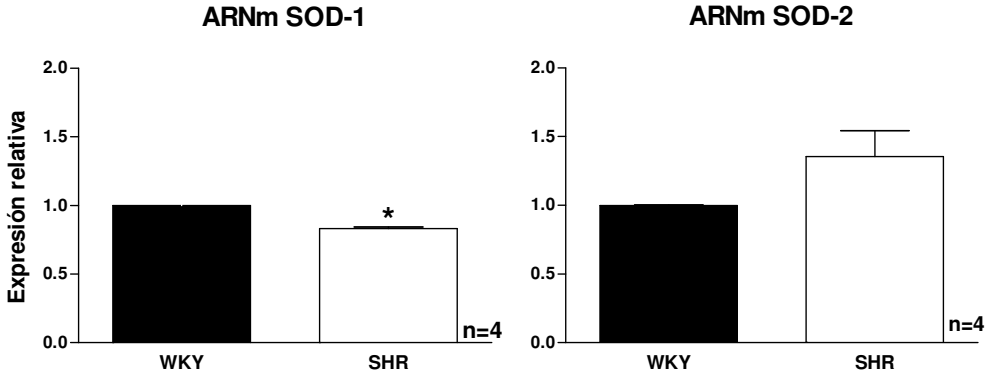


Fig. **73**: Expresión relativa del ARNm de SOD-1 y SOD-2 en cultivos de CMLV de aorta de ratas SHR respecto a cultivos procedentes de WKY. La expresión se normalizó en cultivos de ambas cepas utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Tras la estimulación con 10 ng/ml de IL-1β durante 24 horas, la expresión del ARNm de SOD-1 se incrementó significativamente sólo en cultivos de CMLV procedentes de SHR (Fig. 74), de manera que al final del periodo de estimulación los niveles de ARNm de SOD-1 se igualaron en ambas cepas (Fig. 75).

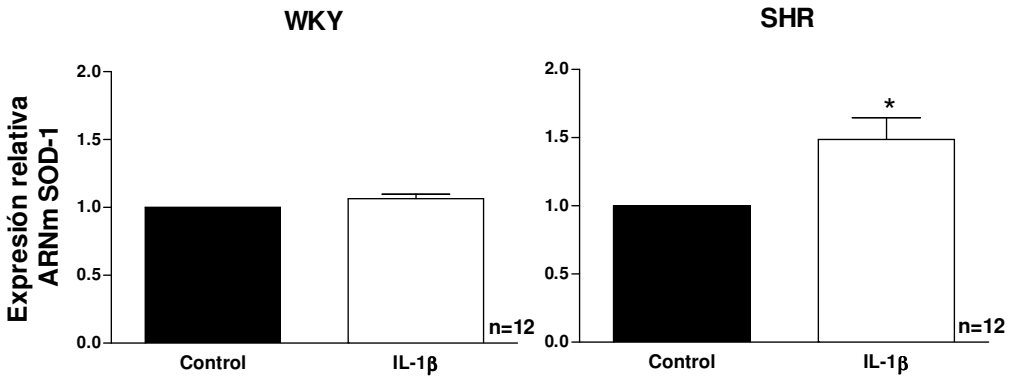


Fig. 74: Efecto del tratamiento durante 24 horas con IL-1β (10 ng/ml) sobre la expresión del ARNm de SOD-1 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa con respecto a los niveles de ARNm de cultivos en situación control. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 por t de Student pareada.

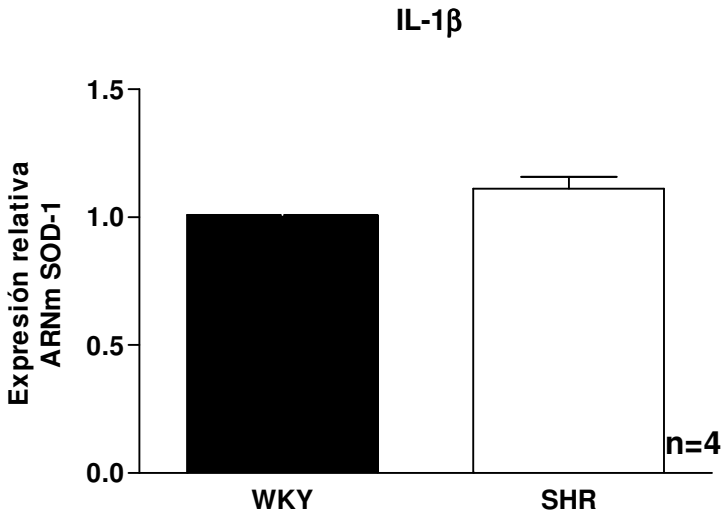


Fig. 75: Expresión del ARNm de SOD-1 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR respecto a WKY tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

El tratamiento con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa apocinina (30 μM) redujo la expresión del ARNm de SOD-1 inducida por IL-1β (10 ng/ml durante 24 horas) en CMLV procedentes de SHR (Fig. 76). Este resultado sugiere que el incremento en los niveles de SOD-1 por IL-1β depende del aumento en la producción de anión superóxido por la NAD(P)H oxidasa, cuya expresión, como ya se determinó anteriormente, fue también inducida por IL-1β.

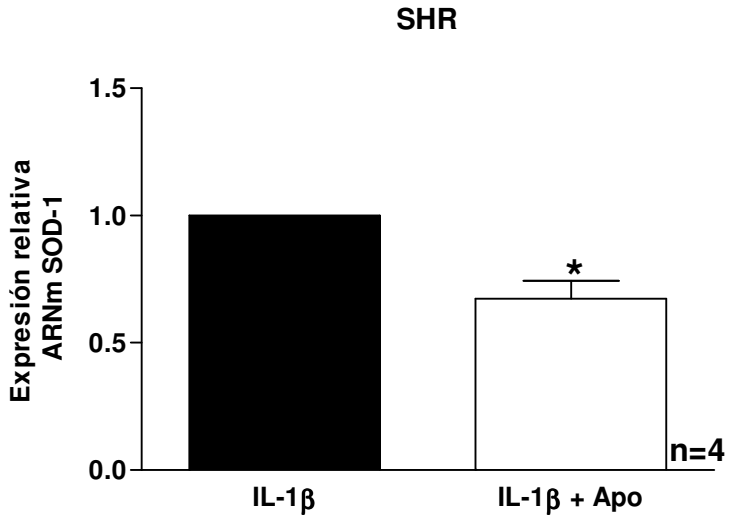


Fig. **76**: Efecto de apocinina (Apo, 30 μM) sobre la expresión del ARNm de SOD-1 en cultivos de CMLV de SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por t de Student pareada.

De igual manera que la SOD-1, la exposición a IL-1β (10 ng/ml) incrementó la expresión del ARNm de SOD-2 sólo en cultivos de CMLV de aortas procedentes de SHR (Fig. 77); sin embargo, y a diferencia de la SOD-1, tras las 24 horas en presencia de la citoquina los niveles de ARNm de SOD-2 fueron superiores en CMLV de SHR que de WKY (Fig. 78).

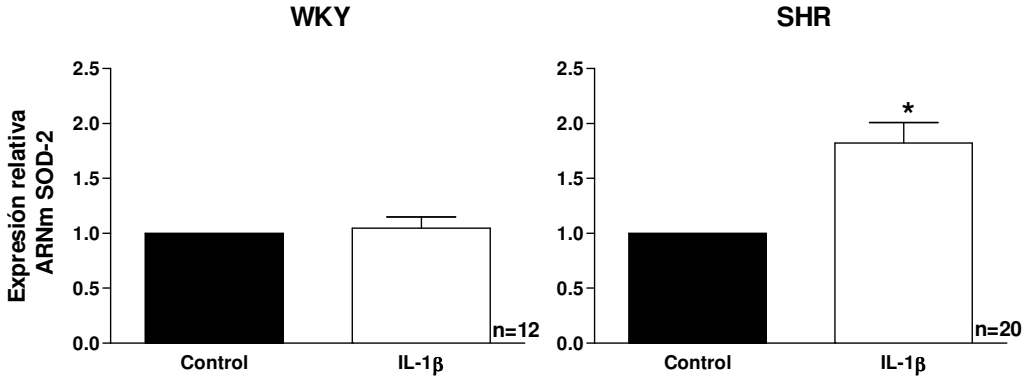


Fig. **77**: Efecto del tratamiento durante 24 h con IL-1β (10 ng/ml) sobre la expresión del ARNm de SOD-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa con respecto a los niveles de ARNm de cultivos en situación control. La expresión se normalizó usando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t de Student pareada.

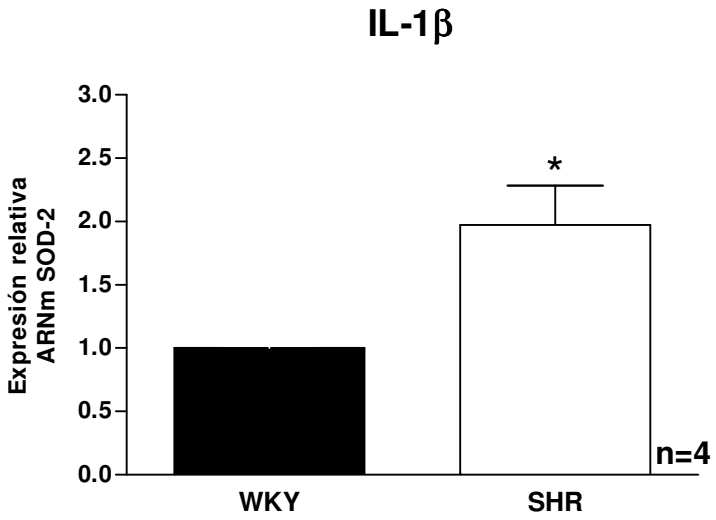


Fig. **78**: Expresión relativa del ARNm de SOD-2 en cultivos de CMLV de aorta de SHR respecto a WKY tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por test no paramétrico de Mann-Whitney.

El tratamiento con apocinina (30 μM) no modificó la expresión del ARNm de SOD-2 inducida por el tratamiento durante 24 horas con IL-1β (10 ng/ml). Similar resultado se obtuvo tras el tratamiento con alopurinol (0,1 mM), inhibidor de otra enzima productora de anión superóxido a nivel vascular, la xantina oxidasa (Fig. 79), lo que sugiere que el incremento en la expresión de SOD-2 inducido por IL-1β no está asociado al incremento en los niveles de anión superóxido.

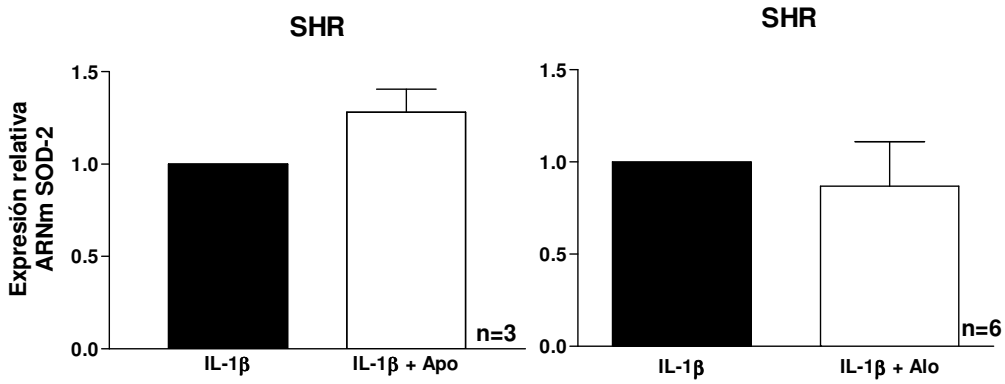


Fig. 79: Efecto de apocinina (Apo, 30 μM) y alopurinol (Alo, 100 μM) sobre la expresión del ARNm de SOD-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

5.4.2. Efecto de pioglitazona sobre la expresión de SOD-1 y SOD-2 inducida por IL-1β en CMLV de ratas normotensas e hipertensas

El tratamiento con pioglitazona (10 μM) incrementó la expresión basal del ARNm de SOD-1 sólo en cultivos celulares procedentes de ratas SHR (Fig. 80), sugiriendo que la activación de PPARγ juega un papel en la expresión de la SOD-1 y, por lo tanto, en la activación de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, pioglitazona no modificó la expresión del ARNm de SOD-1 en cultivos procedentes de ambas cepas estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) (Fig.81).

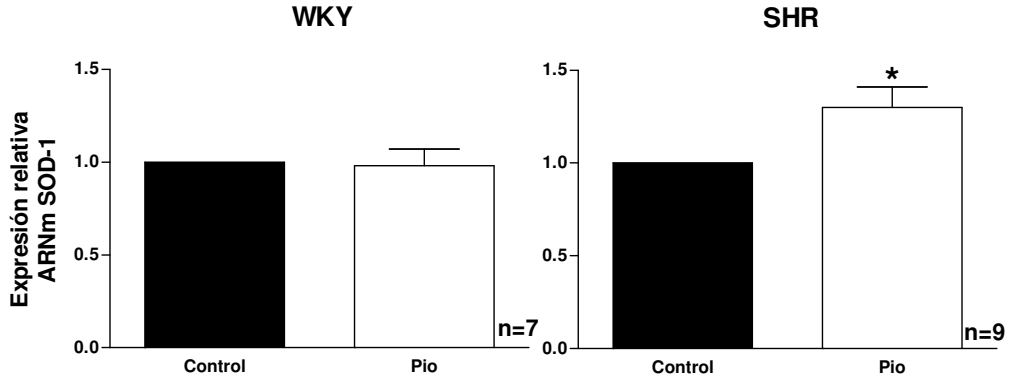


Fig. 80: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de SOD-1 en cultivos de CMLV de ratas WKY y SHR en situación control La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

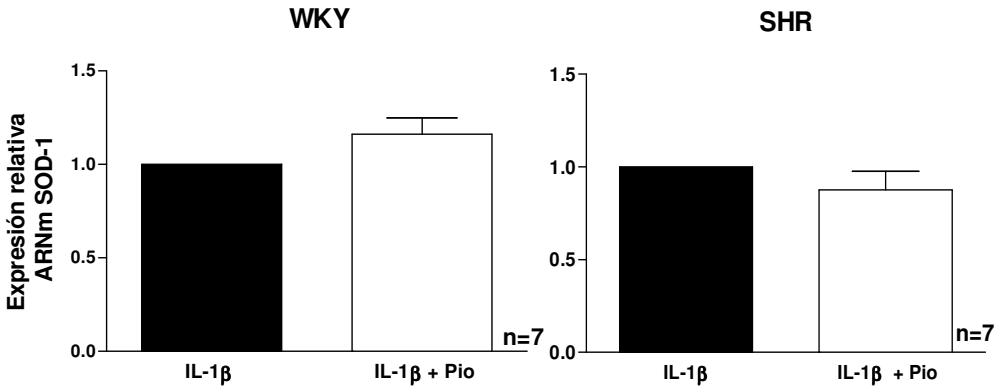


Fig. **81**: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la expresión del ARNm de SOD-1 en cultivos de CMLV de ratas WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno.

El tratamiento con pioglitazona (10 μM) no modificó la expresión basal del ARNm de SOD-2 en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR y la redujo en cultivos procedentes de ratas WKY (Fig. 82). Tras la estimulación con IL-1β, la activación de PPARγ con pioglitazona, al igual que sucedía con la SOD-1, tampoco modificó la transcripción de esta isoforma (Fig. 83).

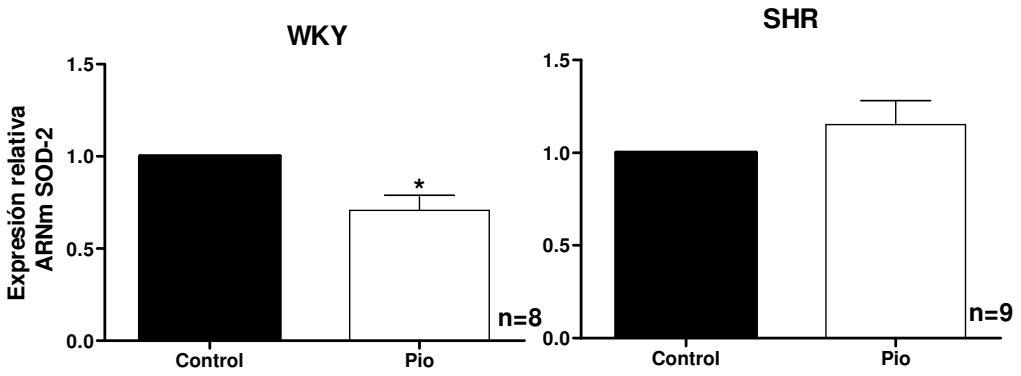


Fig. 82: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 µM) sobre la expresión del ARNm de SOD-2 en cultivos de CMLV de ratas WKY y SHR en situación control. La expresión se normalizó para cada cultivo utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.01 por t Student pareada.

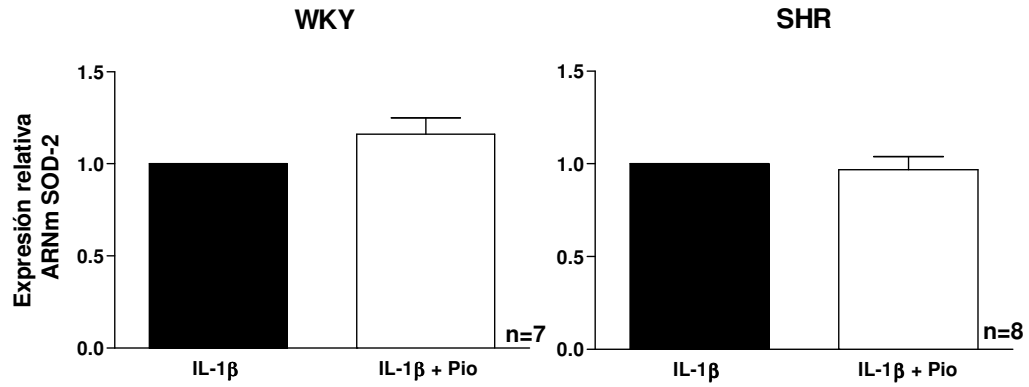


Fig. 83: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 µM) sobre la expresión del ARNm de SOD-2 en cultivos de CMLV de ratas WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

5.5. EFECTO DE PIOGLITAZONA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE H_2O_2 INDUCIDA POR IL-1β

De forma similar a lo observado con el anión superóxido, el tratamiento con pioglitazona (10 µM) redujo la producción de H_2O_2 inducida por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en cultivos de CMLV procedentes de SHR (Fig. 84).

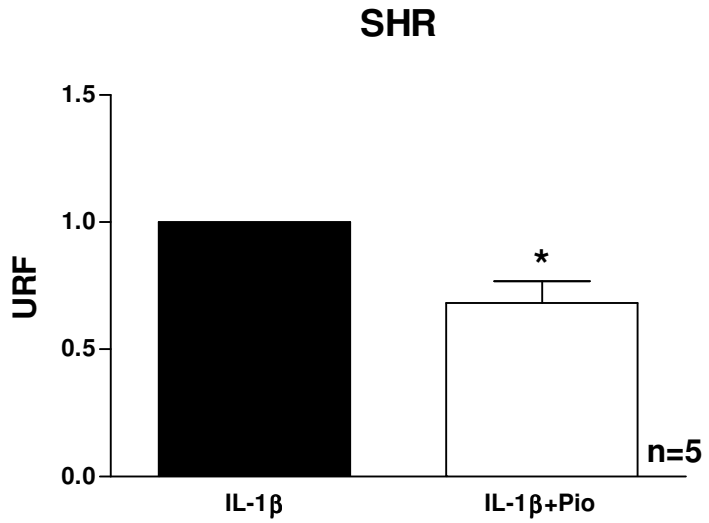


Fig. 84: Efecto del tratamiento con pioglitazona (Pio, 10 μM) sobre la producción de H_2O_2 inducida por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en cultivos de CMLV procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) están expresados en unidades relativas de fluorescencia (URF). *p<0.05 por t de Student pareada.

5.6. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PPARγ SOBRE LA EXPRESIÓN DE CATALASA

5.6.1. Efecto de IL-1β sobre la expresión de catalasa enCMLV de ratas normotensas e hipertensas

La catalasa es una enzima citoplasmática que presenta propiedades antioxidantes, ya que es capaz de transformar especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2, en especies neutras como el H_2O y O_2. El análisis de la expresión del ARNm de catalasa en condiciones basales no mostró diferencias significativas en CMLV procedentes de aorta de animales normotensos e hipertensos (Fig. 85).

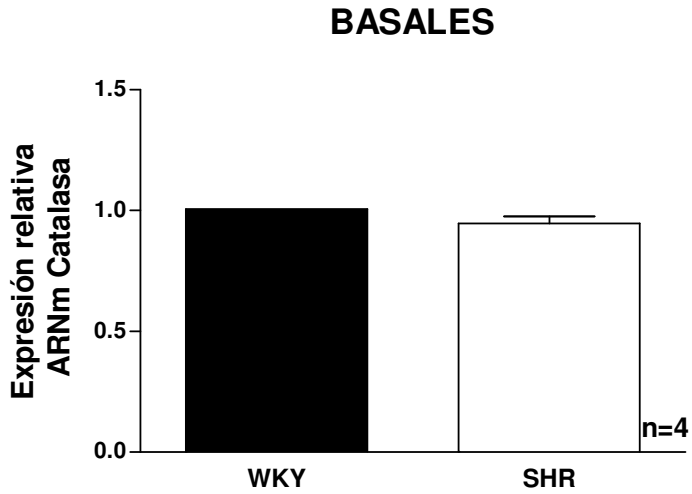


Fig. 85: Expresión del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de SHR respecto a cultivos procedentes de WKY. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

Tras la incubación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas, la expresión del ARNm de catalasa sólo se incrementó en CMLV de SHR (Fig. 86), de tal manera que al final del periodo de estimulación los niveles de ARNm de catalasa fueron superiores en CMLV procedentes de aorta de SHR (Fig. 87).

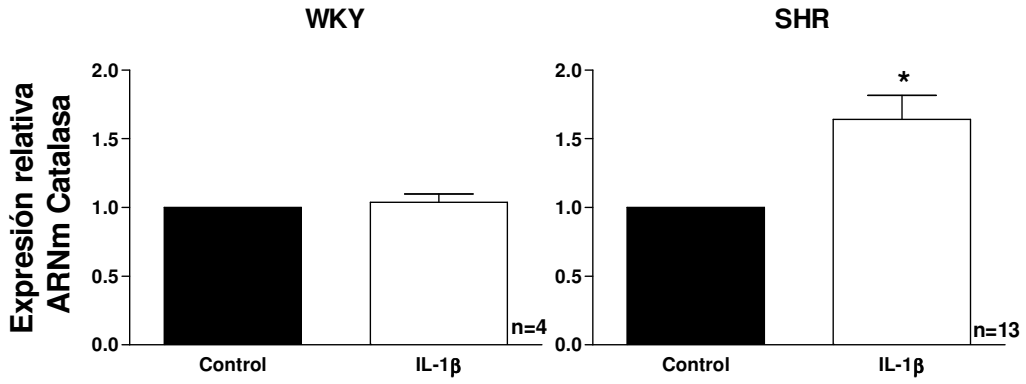


Fig. 86: Efecto del tratamiento durante 24 h con IL-1β (10 ng/ml) sobre la expresión del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas WKY y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa con respecto a los niveles de ARNm de cultivos en situación control. La expresión se normalizó para cada cultivo utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.01 por t Student pareada.

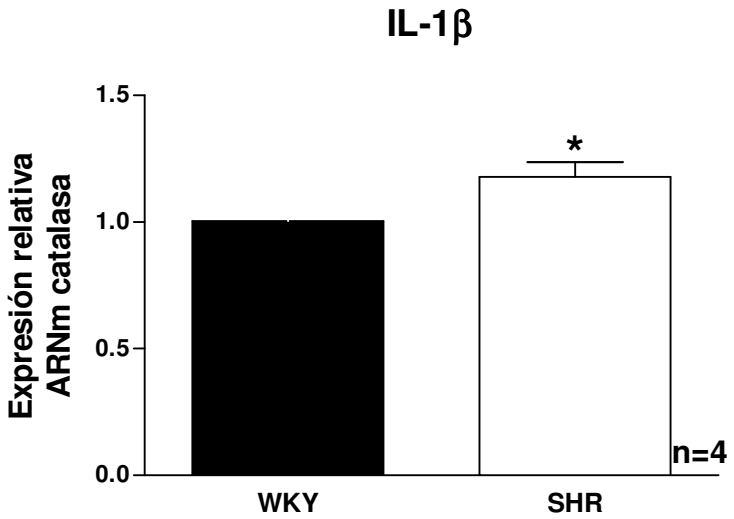


Fig. **87**: Expresión del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de SHR respecto a WKY tras la estimulación con IL-1β (10 ng/ml) durante 24 horas. La expresión se normalizó utilizando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0,05 por el test no paramétrico de Mann-Whitney.

El tratamiento de CMLV de SHR con el inhibidor de la NAD(P)H oxidasa apocinina (30 μM) redujo la expresión del ARNm de catalasa inducida por el tratamiento durante 24 horas con IL-1β (10 ng/ml) (Fig. 88).

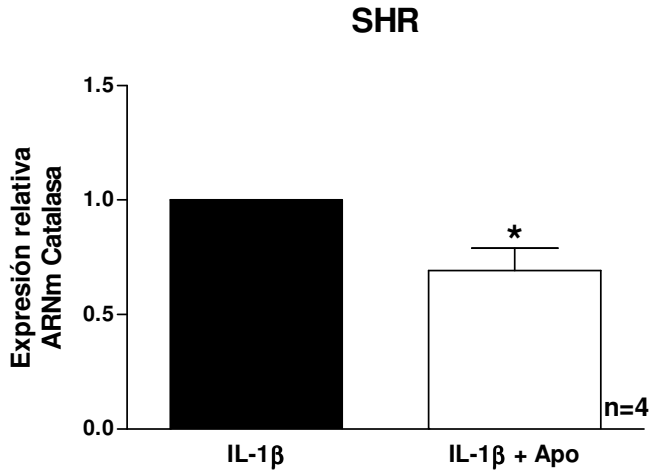


Fig. 88: Efecto de apocinina (Apo, 30 μM) sobre la expresión relativa del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó para cada cultivo utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t Student pareada.

Por otro lado, el tratamiento con catalasa exógena (1000 U/ml) redujo la expresión del ARNm de catalasa inducida por IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en CMLV procedentes de ratas SHR (Fig. 89), mientras que el tratamiento con H_2O_2 exógeno (50 μM) durante 90 minutos la incrementó (Fig. 90). Estos resultados indican que el incremento en los niveles de anión superóxido y H_2O_2 asociado a la mayor actividad de la NAD(P)H oxidasa por IL-1β, parece estar implicado en el incremento de la transcripción de catalasa, probablemente como mecanismo antioxidante.

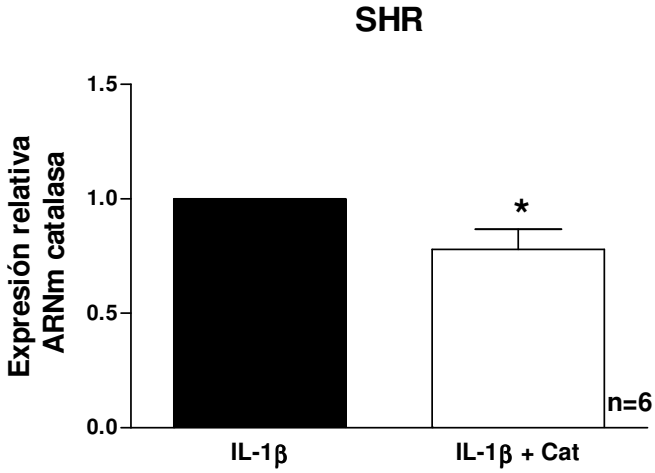


Fig. 89: Efecto de catalasa (1000 U/ml) sobre la expresión del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de aorta procedentes de SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

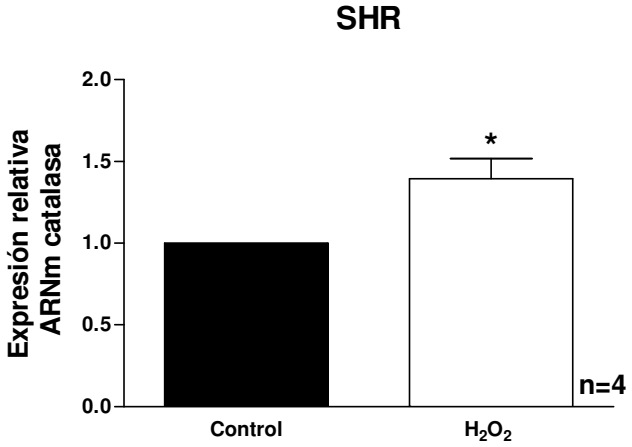


Fig. 90: Efecto de H_2O_2 (50 µM, 90 minutos) sobre la expresión del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas y SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos en situación control. La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 por t de Student pareada.

5.6.2. Efecto de la pioglitazona sobre la expresión de catalasa en presencia de IL-1β

El tratamiento con el activador PPARγ pioglitazona (10 µM) no modificó la expresión del ARNm de catalasa inducida por IL-1β (10 ng/ml) en cultivos de ninguna de las dos cepas (Fig. 91).

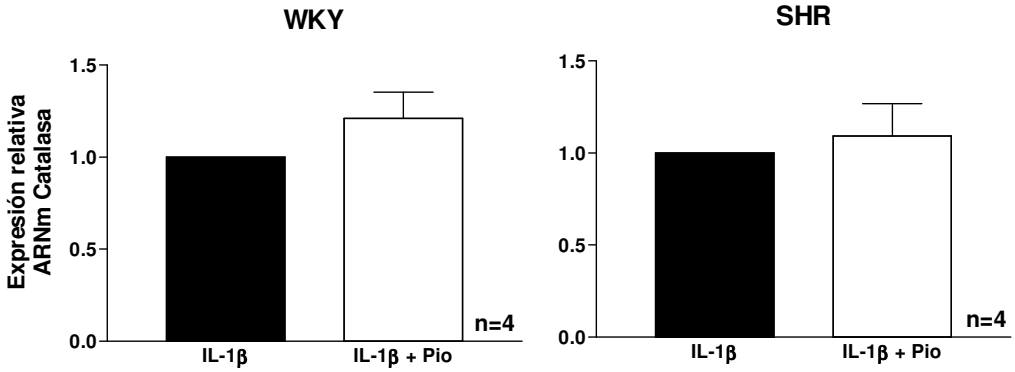


Fig. 91: Efecto de pioglitazona (Pio, 10 µM) sobre la expresión del ARNm de catalasa en cultivos de CMLV de ratas WKY y SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como el valor medio ± ES.

5.6.3. Efecto de la transfección con siRNA de PPARγ sobre la expresión de catalasa inducida por IL-1β en CMLV de SHR

La reducción en la expresión de ARNm de PPARγ inducida por ARN de interferencia (5 nM) en presencia de IL-1β, redujo asimismo la transcripción de catalasa en los cultivos de CMLV de SHR (Fig. 92), sugiriendo que la activación endógena de PPARγ participa en el incremento en la expresión de catalasa inducida por IL-1β.

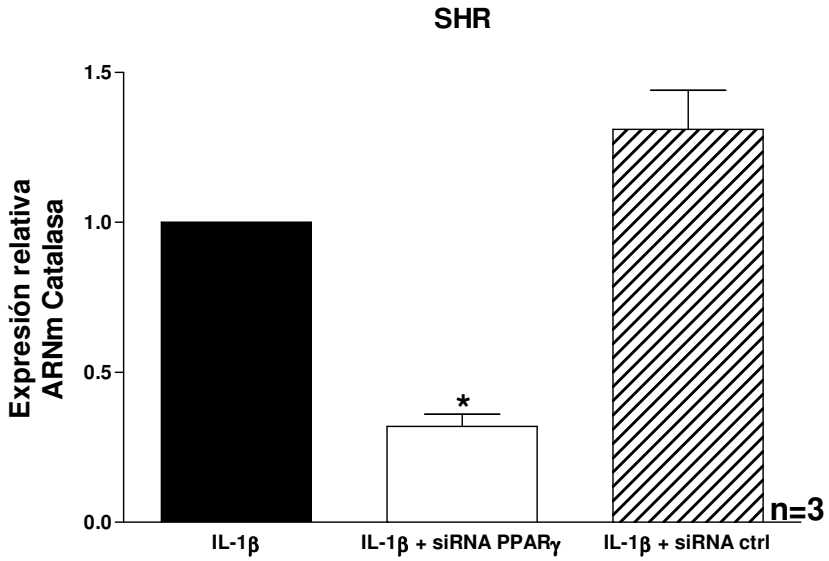


Fig. 92: Expresión del ARNm de catalasa en CMLV de ratas SHR estimuladas con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas) en presencia de siRNA específico de PPARγ (5 nM) y de un siRNA control. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos estimulados con IL-1β. La expresión se normalizó para cada cultivo usando ciclofilina D como control endógeno. Los resultados se expresan como valor medio ± ES. *$p < 0.01$ por ANOVA de una vía.

5.7. EFECTO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO SOBRE LA EXPRESIÓN DE PPARγ

5.7.1. Efecto del tratamiento de apocinina y catalasa sobre la expresion de PPARγ en CMLV de SHR en presencia de IL-1β

El tratamiento con apocinina no modificó la expresión del ARNm de PPARγ inducida por IL-1β en cultivos de CMLV de SHR (Fig. 93), sugiriendo que la expresión del receptor no se regula por el incremento en los niveles de anión superóxido inducido por IL-1β. Sin embargo, el tratamiento de CMLV con catalasa exógena (1000 U/ml) sí redujo la expresión del ARNm de PPARγ inducida por IL-1β, indicando que el incremento en los niveles de H_2O_2 por IL-1β, además de inducir la expresión de COX-2, está implicado en el incremento de expresión de PPARγ (Fig. 93).

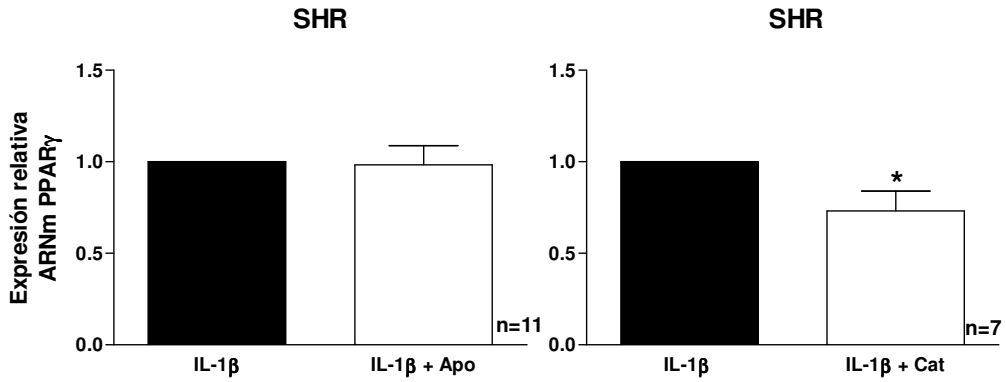


Fig. 93: Efecto de apocinina (Apo, 30 μM) y catalasa (Cat, 1000 U/ml) sobre la expresión del ARNm de PPARγ en cultivos de CMLV de SHR estimulados con IL-1β (10 ng/ml, 24 horas). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. Los resultados se expresan como media ± ES. *p< 0.05 por t de Student pareada.

5.7.2. Efecto de la adición exógena de H_2O_2 sobre la expresión de PPARγ en CMLV de SHR

La adición exógena de H_2O_2 (50 μM) durante 90 minutos indujo la expresión del ARNm de PPARγ en cultivos procedentes de SHR (Fig. 94). El tratamiento con catalasa (1000 U/ml) redujo los niveles de PPARγ inducidos por el H_2O_2, indicando la especificidad del efecto del H_2O_2 sobre la expresión de PPARγ.

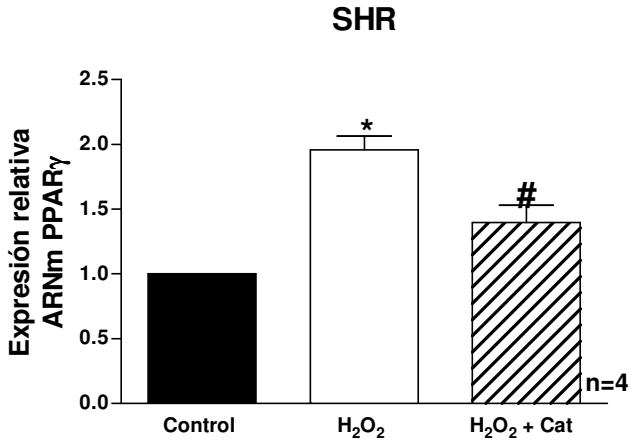


Fig. 94: Efecto del H_2O_2 exógeno (50 μM, 90 minutos) en ausencia y presencia de catalasa (Cat, 1000 U/ml) sobre la expresión del ARNm de PPARγ en cultivos de CMLV de aorta procedentes de ratas SHR. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto a los niveles de ARNm de cultivos no estimulados (control). La expresión se normalizó utilizando β_2 microglobulina como control endógeno. *p< 0.05 vs control; # p< 0.05 vs H_2O_2 por ANOVA de una vía.

DISCUSIÓN

1. EXPRESIÓN DE COX-2 EN SEGMENTOS AÓRTICOS

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo habían demostrado que la respuesta contráctil a fenilefrina era ligeramente superior en segmentos aórticos procedentes de animales hipertensos cuando se comparaba con sus controles normotensos (Álvarez y col., 2005). Junto con esta diferencia en la contractilidad se producía una mayor participación de prostanoides contráctiles derivados de la isoforma inducible de la ciclooxigenasa (COX-2). Así, se observó que el inhibidor selectivo de la COX-2 NS 398 y el antagonista de los receptores TP SQ 29,548 reducían la contracción a fenilefrina en mayor medida en vasos de ratas SHR; además, la producción de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 y la expresión de ésta eran mayores en segmentos procedentes de SHR (Álvarez y col., 2005). Resultados similares han descrito otros investigadores en distintos modelos de hipertensión para las respuestas a angiotensina II (Zerrouk y col., 1998) y noradrenalina (Adeagbo y col., 2005), así como en arterias sin endotelio de ratas SHR-"*stroke prone*" (SHR-SP) incubadas con IL-1β (Dorrance, 2007).

En el presente trabajo hemos analizado la expresión del ARNm de COX-2 en segmentos de aorta torácica y hemos observado que los niveles de ésta eran superiores en las ratas SHR, y que durante el transcurso del experimento la expresión del ARNm de COX-2 aumentaba en ambas cepas, siendo ste incremento mayor en ratas SHR. Así, tras 6 horas de incubación en KHS, tiempo que tardaron en realizarse los experimentos de reactividad vascular, la expresión del ARNm de COX-2 fue superior en ratas SHR. Resultados similares fueron obtenidos por nuestro grupo al analizar la expresión de la proteína por Western blot tanto en aorta (Álvarez y col., 2005) como en arterias mesentéricas de rata (Briones y col., 2002), al igual que por otros autores en arterias de animales hipertensos (Henrion y col., 1997; García-Cohen y col., 2000; Adeagbo y col., 2005). Puesto que la expresión de la proteína disminuyó en segmentos de SHR en presencia de dexametasona (Alvarez y col., 2005), suponemos que existe una inducción de la proteína a lo largo del experimento. Aunque no conocemos la naturaleza del estímulo implicado en esta inducción, es posible que pequeños niveles de LPS presentes en la solución de incubación (Knowles y col., 1990) o el trauma que supone la extracción de la aorta (Charette y col., 1995), estén contribuyendo a dicha inducción. Así, estos resultados sugieren que tanto el incremento en los niveles basales como el aumento en la inducción de la expresión de COX-2 durante la incubación en KHS en los segmentos procedentes de ratas SHR podrían estar relacionados con un incremento en la transcripción de este gen, lo cual ayudaría a explicar la mayor participación de prostanoides contráctiles en la respuesta a fenilefrina que se había observado con la hipertensión (Álvarez y col., 2005).

1.1. PAPEL DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN SEGMENTOS AÓRTICOS PROCEDENTES DE RATAS SHR Y WKY

La hipertensión presenta, entre otras alteraciones, un elevado grado de activación del sistema renina-angiotensina. Además de otros efectos, la angiotensina II presenta la capacidad de inducir en la pared vascular la expresión de COX-2 (Ohnaka y col., 2000; Hu y col., 2002). En estudios funcionales se ha comprobado que la mayor participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina observada en segmentos procedentes de animales hipertensos, está asociada a una mayor activación del RAS (Álvarez y col., 2007). Al analizar los niveles de expresión del ARNm de COX-2 en segmentos recién extraídos de ratas SHR tratadas con el antagonista de los receptores AT-1 losartán se observó que dicha expresión era menor respecto a su control no tratado, no observándose ninguna diferencia en los animales normotensos tras este tratamiento. Por otra parte, la expresión al cabo de 6 horas de incubación en KHS fue también menor en segmentos procedentes de animales hipertensos tratados con losartán que en su correspondiente grupo control, sin encontrarse diferencias tras el tratamiento en los segmentos de los animales normotensos; similares resultados se obtuvieron estudiando la expresión de la proteína por técnicas de western blot (Álvarez y col., 2007). De acuerdo con nuestros resultados, otros investigadores han descrito disminución en la expresión de COX-2 tras el tratamiento con losartán en un modelo animal de fibrosis renal (Manucha y col., 2004), aunque Hocherl y col. (2001) han observado que candesartán, otro antagonista AT-1, incrementaba la expresión de COX-2 en la corteza renal de ratas SHR de cinco semanas de edad, sin alterar la expresión en ratas viejas. Por lo tanto, a la vista de estos resultados, parece claro que la mayor producción de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 en la respuesta a fenilefrina observada en animales hipertensos se puede deber, al menos en parte, a los mayores niveles de angiotensina II circulante, pues cuando se inhibe su ruta a nivel del receptor AT-1, los niveles de expresión de COX-2 se reducen. Confirmando esto, observamos que la estimulación de CMLV de ratas SHR con angiotensina II indujo la expresión de COX-2 tanto a nivel de ARNm como de proteína, reduciéndose dicha expresión en presencia de losartán

La inducción de COX-2 en animales hipertensos puede ser debida a una mayor activación de NFκB (Newton y col., 1997) por los mayores niveles de angiotensina II circulantes descritos en la hipertensión (Sanz-Rosa y col., 2005a). El NFκB es un factor de transcripción que en respuesta a distintos estímulos se libera de su inhibidor IκB translocándose al núcleo y uniéndose a secuencias de unión específicas en la región promotora de numerosos genes diana (Bowie y O´Neill, 2000; Chung y Suhr, 2004; Tsatsanis y col., 2006). Existe una relación directa entre el grado de activación del RAS y la activación de NFκB, como demuestra el resultado obtenido por Muller y col. (2000b) donde la inhibición de este factor de transcripción proinflamatorio en ratones dobles transgénicos que sobreexpresan el gen de la renina y el del angiotensinógeno redujo la presión sanguínea y la hipertrofia cardiaca. De este modo, en la hipertensión, la mayor expresión de COX-2 podría deberse al incremento en la activación de NFκB inducida por la angiotensina II (Hu y col., 2002). Esta conclusión es coherente con los resultados obtenidos por Sanz-Rosa y col. (2005a); usando el inhibidor de los receptores AT-1 candesartán en aortas procedentes de SHR, este grupo mostró la relación directa entre los niveles elevados de angiotensina II y la activación de NFκB, aumentando la expresión de este factor de transcripción y disminuyendo la de su represor IκB.

El incremento en el estrés oxidativo parece ser uno de los principales factores que pueden contribuir al aumento en la expresión de COX-2, como se ha descrito en distintos tipos celulares incluyendo monocitos (Lu y Wahl, 2005), células mesangiales (Jaimes y col., 2005) o cardiomiocitos (Peng y col., 2005). La angiotensina II es un potente activador de la NAD(P)Hox, principal fuente vascular de la producción de anión superóxido (Rajagopalan y col., 1996; Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001b; Zhou y col., 2003). La NAD(P)Hox prototípica está formada por cinco subunidades, tres subunidades citosólicas, p47phox, p67phox y p40phox y dos subunidades transmembrana, p22phox y gp91phox o NOX-2, que forman el complejo catalítico y constituyen el citocromo b558. Existe una familia entera de NAD(P)Hox que difieren en la subunidad gp91phox presente en fagocitos, que es sustituida por subunidades homólogas, de las cuales se han descrito hasta la fecha seis subunidades: NOX-1, NOX-3, NOX-4, NOX-5, DUOX-1 y DUOX-2. De éstas, NOX-2, NOX-1 y NOX-4 están presentes a nivel vascular, expresándose en CMLV las dos últimas (Griendling, 2006; Ambasta y col., 2006; Bedard y Krause, 2007). Los resultados obtenidos por Mollnau y col. (2002), en los cuales la perfusión con angiotensina II en ratones incrementaba la expresión de la subunidad NOX-1, junto con los obtenidos por Dikalova y col. (2005), donde la sobreexpresión de esta subunidad potenciaba la hipertensión inducida por angiotensina II, confirman el importante papel de esta subunidad en el desarrollo de la patología hipertensiva. De acuerdo con esta hipótesis, ratones deficientes en NOX-1 estimulados con angiotensina II producen menos ROS, menores respuestas vasoconstrictoras y mejores relajaciones dependientes de endotelio (Matsuno y col., 2005). Recientemente, Dikalov y col. (2008), trabajando con ARNs de interferencia para las subunidades NOX-1 y NOX-4, propusieron a la NOX-1 como la principal subunidad implicada en el incremento en el estrés oxidativo inducido por estímulos prooxidantes como la angiotensina II. Así, el aumento descrito en la actividad de la NAD(P)H oxidasa y en el estrés oxidativo (Matsuno y col., 2005), así como el aumento de la presión arterial (Gavazzi y col., 2006) observados en la hipertensión, podrían estar relacionados con alteraciones en la expresión de esta enzima prooxidante. La reducción de la expresión de COX-2 inducida por angiotensina II observada en CMLV de aorta de SHR tras el tratamiento con los inhibidores de la NAD(P)Hox apocinina y de la xantina oxidasa alopurinol, confirma la relación entre el estrés oxidativo inducido por este péptido y la expresión de COX-2. En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo se ha demostrado que en animales hipertensos hay un incremento en el estrés oxidativo plasmático y vascular que se normaliza tras el traamiento con losartán (Álvarez y col., 2007). Para comprobar si el incremento en el estrés oxidativo inducido por la angiotensina II se podía relacionar con un incremento en la subunidad catalítica de la NAD(P)Hox NOX-1, en cultivos de CMLV procedentes de SHR analizamos la expresión de dicha subunidad comprobando que, efectivamente, este péptido incrementaba la expresión de NOX-1 a través de la activación de receptores AT-1, ya que este aumento se redujo tras el tratamiento con losartán. Estos resultados nos permiten sugerir que el mecanismo por el cual la angiotensina II incrementa la expresión de COX-2 en ratas SHR puede ser aumentando la expresión de la NAD(P)Hox y, por lo tanto, la producción de $O_2^{\cdot-}$ derivado de ésta.

El tratamiento con losartán, además de reducir la expresión de COX-2 y los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en segmentos aórticos de ratas SHR, también redujo la presión sanguínea (Álvarez y col., 2007). En este sentido, Rey y col. (2001) determinaron que la activación de la NAD(P)Hox por angiotensina II y el incremento en la producción vascular de anión superóxido era uno de los mecanismos por el cual este componente del RAS

incrementaba la presión arterial. De ese modo, los resultados obtenidos sugieren que la reducción de la presión arterial y de la expresión de COX-2 en animales hipertensos observada tras el tratamiento con losartán puede estar asociada a una reducción en el estrés oxidativo y, concretamente, a la reducción en la expresión de la subunidad catalítica de la principal fuente vascular de $O_2^{\cdot-}$ la NAD(P)Hox.

1.2. PAPEL DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EN LA EXPRESIÓN DE PPAR EN SEGMENTOS AÓRTICOS PROCEDENTES DE RATAS SHR Y WKY

En los últimos años, cada vez se ha hecho más evidente el carácter inflamatorio de patologías vasculares como la hipertensión. Asociado a estos eventos inflamatorios, los receptores nucleares PPAR están cobrando interés, debido a que su activación posee propiedades antiinflamatorias por su capacidad para interferir las rutas de señalización mediadas por NFκB o AP-1, factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios, como puede ser COX-2 (Bowie y O´Neill, 2000; Chun y Suhr, 2004; Tsatsanis y col., 2006). Los PPAR son receptores nucleares que tras ser activados y heterodimerizar con el receptor X del ácido retinoico, son capaces de inducir la transcripción de genes implicados en el metabolismo a través de su unión a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a PPAR (PPRE) localizados en sus regiones reguladoras. Hasta el momento se han descrito tres isoformas (α, β/δ y γ) codificadas por tres genes diferentes. Puesto que las tres isoformas de PPAR se expresan, además de en tejidos implicados en el metabolismo celular, en el sistema cardiovascular (Schiffrin y col., 2003; Hsueh y Bruemmer, 2004), es previsible que estos receptores nucleares puedan ejercer efectos relevantes a este nivel. Así, los PPARs parecen ejercer un importante papel en la regulación de la presión arterial. En este sentido, se ha demostrado que la activación tanto de PPARγ como de PPARα reduce la hipertensión y mejora la disfunción endotelial en arterias mesentéricas de pequeño calibre de ratas Sprague-Dawley perfundidas con angiotensina II (Diep y col., 2002a; 2002b); además, el tratamiento con TZDs previene el incremento en la expresión de los receptores AT-1 y AT-2 observado en este modelo de hipertensión (Diep y col., 2002a). En relación con sus efectos vasculares, los activadores de PPARγ mejoran la disfunción endotelial, probablemente a través de mecanismos relacionados con sus propiedades antioxidantes. Así, la activación de PPARγ reduce la expresión de distintas subunidades de la NAD(P)Hox inhibiendo la producción de $O_2^{\cdot-}$ y, por lo tanto, aumentando la biodisponibilidad del NO (Hwang y col., 2005; 2007; Sorrentino y col., 2007). Además de la regulación genómica causada por la activación de PPARγ, rosiglitazona induce respuestas vasodilatadoras de forma independiente de los niveles de NO o de la propia activación de PPARγ, lo que puede contribuir a explicar la reducción de la presión arterial y la mejora en la función vascular observada tras el tratamiento con este fármaco (Ryan y col., 2004).

Al analizar la expresión de PPARγ observamos que los niveles de su ARNm fueron inferiores en segmentos aórticos recién extraídos de ratas SHR, lo que era coherente con una menor capacidad para antagonizar factores de transcripción proinflamatorios como NFκB o AP-1 y, por lo tanto, con la mayor expresión de COX-2 detectada en los animales hipertensos. La reducción en los niveles de expresión de los receptores PPARγ en segmentos de animales hipertensos está de acuerdo con los obtenidos por Ameshima y col. (2003) en modelos de hipertensión pulmonar severa y por Wu y col. (2004) en ratas SHR; sin embargo, son contrarios a los encontrados por Diep y Schiffrin (2001), quienes mostraron en aorta y arterias

mesentéricas de SHR, tanto en fase de prehipertensión como una vez establecida la hipertensión, un incremento en la expresión de PPARα y PPARγ. Por su parte, Xiong y col. (2005) demostraron en distintos tejidos, entre los que se encontraba la aorta, que la expresión de PPARγ estaba disminuida con la hipertensión, pero sólo a nivel de la proteína, ya que los niveles de su transcrito estaban aumentados. La gran variabilidad de resultados obtenidos en estos estudios ha sido observada incluso en animales de la misma cepa y se ha explicado por variaciones genéticas (Xiong y col., 2005). El incremento en la expresión de COX-2 y de citoquinas proinflamatorias observado en el envejecimiento se ha asociado también con la reducción en los niveles de expresión de PPARγ (Wu y col., 2007), confirmando la relación inversa entre los niveles de expresión este receptor nuclear y la de COX-2 u otros mediadores proinflamatorios y, por tanto, con el incremento de la respuesta inflamatoria. De ese modo, la reducción en la expresión de PPARγ podría estar implicada en la inflamación vascular asociada a la hipertensión, entre otras causas, porque alteraciones en su expresión podrían relacionarse con el deterioro de los mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes de los que es responsable este receptor nuclear. Durante las 6 horas de incubación en KHS, observamos un descenso en la expresión de PPARγ, tanto en segmentos de WKY como en segmentos de SHR, que fue mayor en las ratas SHR, de manera que la expresión, en estas condiciones, fue menor en SHR que en WKY. Este resultado se correlacionaría de nuevo inversamente con una mayor actividad de factores de transcripción proinflamatorios y, por lo tanto, con la mayor inducción de la transcripción del ARNm de COX-2 durante el periodo de incubación en KHS observada en animales hipertensos.

El RAS es uno de los principales implicados en la inflamación vascular asociada a la hipertensión. Por ello, nos planteamos analizar si, además de todas las acciones proinflamatorias ejercidas por la angiotensina II (Suzuki y col., 2003), este péptido podía contribuir al incremento de la inflamación vascular modulando la expresión de PPARγ. En este sentido, estudios llevados a cabo por Tham y col. (2002) demostraron que en presencia de angiotensina II se observaba una disminución en los niveles de expresión de PPARγ y, por consiguiente, del potencial antiinflamatorio vascular. Además, la angiotensina II también puede contribuir a la inhibición de la actividad de PPARγ a nivel postraduccional (Alexis y col., 2009). Para comprobar si la inflamación vascular inducida por angiotensina II era ejercida, además, a través de la modulación de la expresión de PPARγ, se trataron ratas de ambas cepas con el antagonista de los receptores AT-1, losartán. Este tratamiento no modificó la expresión del ARNm de PPARγ en las ratas normotensas. Sin embargo, cuando bloqueamos los receptores AT-1 de angiotensina II en animales hipertensos obtuvimos un importante aumento en la expresión de PPARγ, tanto en condiciones basales como tras la incubación durante seis horas en KHS; por lo tanto, la reducción en la expresión de PPARγ puede contribuir al efecto proinflamatorio de la angiotensina II. Además, como mecanismo independiente de la inhibición de los receptores AT-1, el losartán podría estar activando PPARγ, constituyendo éste un mecanismo adicional por el cual este fármaco puede ejercer las acciones antiinflamatorias e hipotensoras que se le atribuyen (Schupp y col., 2006; Erbe y col., 2006; Storka y col., 2008).

A pesar de que todos los sistemas celulares de la pared vascular presentan los componentes del RAS (Bader y col., 2001), la angiotensina II circulante parece jugar un papel fundamental "*in vivo*" en la reducción de la expresión de PPARγ, ya que en los cultivos de CMLV de SHR empleados en este estudio,

en los cuales la angiotensina II circulante está ausente, la expresión basal de PPARγ fue superior a la de WKY. Este resultado reforzaría la hipótesis de que uno de los mecanismos por los cuales la angiotensina II podría estar contribuyendo a la inflamación vascular sería la inhibición de la expresión de este receptor nuclear. Además, como Sugawara y col. (2001a; 2001b) describieron, la activación de PPARγ también podría estar relacionada con la inhibición de la expresión tanto de los receptores AT-1 como de los del TXA_2, lo cual sería importante en la reducción de la presión arterial así como de las respuestas contráctiles a fenilefrina observadas en la cepa hipertensa. Por tanto, nuestros resultados permiten relacionar los mayores niveles circulantes de angiotensina II con el mayor estado inflamatorio vascular y las alteraciones funcionales observadas en la hipertensión. Esto podría significar un aumento en la actividad de factores de transcripción proinflamatorios implicados en la regulación de la expresión de COX-2, y contribuiría a explicar el aumento en la expresión de esta enzima observada en los segmentos procedentes de ratas SHR.

Al igual que PPARγ, PPARα se expresa en la pared vascular incluso a mayores niveles que la isoforma γ, contribuyendo también a la regulación de la inflamación y la correcta funcionalidad vascular (Staels y col., 1998a; Inoue y col., 1998; Marx y col., 1999; 2002; Hu y col., 2002). En este sentido, Delerive y col. (1999a) relacionaron las propiedades antiinflamatorias de PPARα con su capacidad para inhibir la activación de NFκB y AP-1. Además, puesto que la activación de PPARα reduce el riesgo de accidentes cardiovasculares asociados a desórdenes metabólicos (Staels y Fruchart, 2005; Gervois y col., 2007; Staels, 2007), nos planteamos analizar si también existían alteraciones en los niveles de expresión de este receptor nuclear en la hipertensión. Al analizar la expresión del ARNm de PPARα no se encontraron diferencias significativas entre segmentos de ambas cepas, lo que sugiere que el incremento en la inflamación vascular no se relaciona con alteraciones en la expresión de esta isoforma. Aunque Staels y col. (1998a) describieron en CMLV humanas la capacidad de los receptores PPARα para inhibir la expresión de COX-2, esta relación no se observa en segmentos aórticos recién extraídos; sin embargo, de forma paralela a la inducción del ARNm de COX-2 durante la incubación en KHS, se produjo también un descenso en los niveles de PPARα , por lo que no podemos descartar que la regulación de sus niveles de expresión pudiera ser un factor que contribuya al incremento en la activación de NFκB y AP-1 y, por lo tanto, a la expresión de COX-2 en ambas cepas.

En conclusión los mayores niveles de angiotensina II descritos en la hipertensión contribuirían al descenso en la expresión de genes con función antiinflamatoria como PPARγ. La menor expresión de este receptor nuclear observada en la hipertensión se podría relacionar con un aumento en el grado de activación de NFκB o AP-1 y, por lo tanto, con un aumento en la expresión de genes dependientes de éstos como COX-2 y con las alteraciones funcionales asociadas a este efecto.

2. EXPRESIÓN DE COX-2 EN CULTIVOS DE CMLV

La hipertensión arterial se asocia a un incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias circulantes (Sanz-Rosa y col., 2005a; Pauletto y Rattazzi, 2006; Savoia y Schiffrin, 2006) y en la producción de ROS (Kiritoshi y col., 2003; Álvarez y col., 2007). En el apartado anterior hemos demostrado que el incremento en el nivel de activación del RAS estaba implicado en el aumento de la expresión de COX-2 observado en segmentos aórticos de ratas SHR. Además, en nuestro grupo hemos demostrado que el RAS contribuye al incremento en la participación de prostanoides contráctiles derivados de COX-2 en respuesta a estímulos α-adrenérgicos (Álvarez y col., 2007). La angiotensina II es un potente activador de la producción de citoquinas proinflamatorias, las cuales también son, a su vez, capaces de activar la transcripción de COX-2 (Suzuki y col., 2003; Ruiz-Ortega y col., 2006; Marchesi y Schiffrin, 2006). En este sentido, Sanz-Rosa y col. (2005a) demostraron en ratas SHR un incremento en los niveles de IL-1β tanto plasmáticos como aórticos asociado al aumento en la activación del RAS observado en este modelo de hipertensión. La capacidad de la IL-1β para inducir la expresión de COX-2 ha sido descrita en distintos lechos vasculares, incluyendo arterias pulmonares (Bishop-Bailey y col. 1998; Bradbury y col., 2002), mesentéricas (Briones y col., 2005) y cerebrales (Lacroix y Rivest, 1998), al igual que en cultivos de CMLV (Jiang y col., 2004b), células endoteliales (Uracz y col., 2002), fibroblastos (Deng y col., 2007), células mesangiales (Guan y col., 1998) y cardiomiocitos (Mendez y Lapointe, 2003). Puesto que en ratas SHR se ha descrito un incremento en los niveles de IL-1β, nos planteamos analizar si las alteraciones en la expresión de COX-2 observadas en la hipertensión podían relacionarse con alteraciones en los mecanismos proinflamatorios activados por esta citoquina.

A diferencia de los resultados obtenidos al analizar la expresión de la proteína tanto en arteria mesentérica como en aorta (Briones y col., 2002; Álvarez y col., 2005), y de los obtenidos en este estudio en segmentos aórticos de rata, en condiciones basales no hubo diferencias en los niveles de ARNm de COX-2 entre CMLV procedentes de WKY y SHR. Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden explicarse debido a la notable diferencia entre la situación *"in vivo"* e *"in vitro",* ya que los vasos de animales hipertensos están expuestos crónicamente a niveles elevados de citoquinas, así como de otros mediadores proinflamatorios como la angiotensina II, algo que no ocurre en los cultivos celulares. Así, este resultado sugiere que la mayor expresión de COX-2 encontrada en segmentos aórticos de SHR está íntimamente relacionada 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. Para comprobar esta hipótesis, se estimularon cultivos de CMLV de ambas cepas con IL-1β durante 24 horas y observamos que, efectivamente, la expresión de COX-2 en CMLV de aorta procedentes de ratas SHR se indujo más que en los cultivos procedentes de WKY, de manera que al final del periodo de estimulación los niveles del ARNm de COX-2 fueron superiores en ratas SHR. De ese modo, el incremento en la expresión de COX-2 descrito en segmentos aórticos de animales hipertensos podría ser dependiente, además de la mayor activación del RAS, de la exposición crónica a niveles elevados de IL-1β y/o de una mayor activación en las rutas de señalización proinflamatorias activadas por esta citoquina.

2.1. IL-1β INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE COX-2 EN CMLV DE SHR A TRAVÉS DEL INCREMENTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las ROS son moléculas reactivas derivadas del oxígeno producidas por todas las células eucariotas como resultado del metabolismo oxidativo aerobio. Debido a su vida media, las ROS, a concentraciones intracelulares moderadas, son mediadores clave en las rutas de señalización celular; sin embargo, concentraciones elevadas pueden provocar toxicidad y daño celular (Paravicini y Touyz, 2006; 2008). Las ROS incrementan la expresión de una gran cantidad de moléculas implicadas en el aumento del estado proinflamatorio como citoquinas y enzimas productoras de mediadores inflamatorios como COX-2, debido a su capacidad para activar factores de transcripción como NFκB (Pueyo y col., 2000), AP-1 (Mendes y col., 2003; Wu y col., 2005b) o STATs (Simon y col., 1998), y MAPKs como p38 o ERK 1/2 (Lapointe e Isanovic, 1999).

En distintos modelos de hipertensión vascular se ha descrito un incremento en el estrés oxidativo debido tanto a un aumento en la producción de ROS (Rajagopalan y col., 1995; Zalba y col., 2000; Beswick y col., 2001; Higashi y col., 2002; Álvarez y col., 2007) como a la reducción en la actividad de los sistemas antioxidantes celulares (Redón y col., 2003; Chaves y col., 2007), lo que sugiere que estas ROS pueden desempeñar un papel fundamental en las alteraciones funcionales y estructurales típicamente asociadas a la hipertensión como son el remodelado vascular, el aumento en la reactividad a agentes vasoconstrictores, la reducción de las relajaciones dependientes de endotelio, la hipertrofia de la pared vascular o la respuesta inflamatoria asociada a esta patología (Griendling y col., 2000; Paravicini y Touyz, 2006; 2008).

Puesto que, como previamente se comentó, la principal fuente vascular de ROS es la NAD(P)Hox y que su subunidad catalítica NOX-1 parece ser la principal subunidad implicada en el incremento en el estrés oxidativo inducido por la angiotensina II u otras citoquinas, alteraciones en su expresión con la hipertensión pueden contribuir a explicar el aumento descrito en la actividad de la NAD(P)Hox, el estrés oxidativo y la presión arterial (Matsuno y col., 2005; Gavazzi y col., 2006). Por ello, analizamos si existían diferencias en la expresión de NOX-1 en CMLV de aorta procedentes de ratas hipertensas y normotensas, y de acuerdo con esta hipótesis, en CMLV de ratas SHR la expresión basal del ARNm de NOX-1 fue mayor que en cultivos procedentes de WKY.

Se ha descrito un incremento en la producción de ROS inducido por citoquinas proinflamatorias como IL-1β (Meier y col., 1989) o TNFα (Basuroy y col., 2008). De acuerdo con ello, encontramos que la estimulación con IL-1β incrementó la transcripción de NOX-1 en cultivos de CMLV procedentes tanto de ratas hipertensas como de ratas normotensas, de manera que tras 24 horas de estimulación con IL-1β los niveles de ARNm de NOX-1 siguieron siendo superiores en CMLV de SHR. Resultados similares obtuvieron Miller y col. (2007) en CMLV humanas. Para confirmar si el incremento en la expresión de NOX-1 inducido por IL-1β en CMLV de SHR se acompañaba de un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ se cuantificaron los niveles de esta ROS por el método del dihidroetidio y se comprobó que, efectivamente, esta citoquina incrementaba la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLV de ratas SHR. Puesto que la activación de NFκB es dependiente del incremento en la producción de ROS por NOX-1 (Miller y col., 2007), y los niveles de esta subunidad son mayores en CMLV de SHR, uno de los mecanismos por el cual la IL-1β podría contribuir al incremento de la expresión de COX-2 y a la inflamación vascular asociada a la hipertensión sería a través del aumento en la producción de ROS derivados de la NAD(P)Hox.

Existen datos que sugieren la existencia de un bucle de retroalimentación entre el estrés oxidativo generado por la NAD(P)Hox y la expresión y actividad de la propia enzima. Así, como se detallará más adelante, está descrita la posibilidad de que el $O_2^{\cdot-}$ generado por la NAD(P)Hox pueda ser transformado en H_2O_2, ROS que a su vez también podría activar la NAD(P)Hox (Seshiah y col., 2002; García Redondo y col., 2009). Además, puesto que NOX-1 presenta en el extremo 5´ de su promotor secuencias de unión para NFκB y AP-1, factores de transcripción redox-sensibles (Bedard y Krause, 2007; Cevik y col., 2008), los propios productos de la NAD(P)Hox podrían contribuir al aumento en su expresión. Sin embargo, el tratamiento de CMLV procedentes de ambas cepas con el inhibidor de la NAD(P)Hox apocinina no modificó la expresión de esta enzima, sugiriendo que ese bucle de retroalimentación no existía en este tipo celular o que podría verse compensado, como se describirá más tarde, por el incremento en mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes como los modulados por PPARγ.

Existe una relación entre la expresión de COX-2 y el incremento en la producción de ROS derivados de la NAD(P)Hox. Así, asociado al incremento en la actividad de la NAD(P)Hox se ha descrito un incremento en la expresión de COX-2 en cardiomiocitos estimulados con LPS (Peng y col., 2005), en células mesangiales estimuladas con angiotensina II (Jaimes y col., 2005), en células del músculo circular del esfínter esofágico estimuladas con IL-1β (Cao y col., 2006) o en CMLV estimuladas con angiotensina II (resultados mostrados en este trabajo). El hecho de que el inhibidor de la NAD(P)Hox reduzca los niveles de expresión de COX-2 inducidos por IL-1β en CMLV de SHR, junto con el incremento producido por la citoquina en la expresión de la subunidad NOX-1 y en la producción de $O_2^{\cdot-}$, sugiere que al igual que lo observado tras la estimulación con angiotensina II, el $O_2^{\cdot-}$ producido por la NAD(P)Hox podría estar contribuyendo a la transcripción de COX-2 en este tipo celular. Sin embargo, en CMLV de ratas WKY, el tratamiento con apocinina no redujo la expresión de COX-2 inducida por IL-1β, sugiriendo que, de acuerdo con la menor expresión de NOX-1, la participación de las especies reactivas de oxígeno en la expresión de COX-2 en CMLV procedentes de animales normotensos era menor. Así, la relación entre el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ generados por la NAD(P)H oxidasa y la dependencia de dicha producción de la inducción de COX-2 por IL-1β en CMLV de SHR, sugiere que la activación transcripcional de esta enzima podría ser mediada a través del incremento en el estrés oxidativo inducido por la citoquina, probablemente a través de la activación de factores de transcripción proinflamatorios redox sensibles, aunque serían necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

Otra ROS que contribuye al estrés oxidativo es el H_2O_2. El H_2O_2 se origina a partir de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ por las SODs celulares y es un segundo mensajero con importantes funciones fisiológicas a nivel vascular (Gao y Lee, 2005), aunque al igual que el $O_2^{\cdot-}$, altos niveles pueden provocar toxicidad celular (Hinshaw y col., 1986; Guyton y col., 1996; Zafari y col., 1998). En nuestro modelo, la IL-1β, además de incrementar la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLV de células SHR, también incrementó los niveles de H_2O_2. Tras la inhibición de la NAD(P)Hox con apocinina se redujeron los niveles de H_2O_2 inducidos por IL-1β en CMLV de SHR, lo que nos permite concluir que el H_2O_2 se genera por la activación de la NAD(P)Hox por la IL-1β, bien como resultado del $O_2^{\cdot-}$ producido por esta enzima y de la actividad de las SODs, o bien por su síntesis directa (Zafari y col., 1998). Similares resultados obtuvieron Mendes y col. (2003), los cuales observaron como el tratamiento con DPI, otro inhibidor de la NAD(P)Hox, reducía la activación de AP-1

inducida por el H_2O_2 generado en presencia de IL-1β en condrocitos, confirmando que parte del H_2O_2 responsable de ese efecto provenía de la actividad de la NAD(P)H oxidasa.

El H_2O_2 puede activar rutas de señalización implicadas en el aumento de la expresión de citoquinas como TNFα o IL-8 (Zhao y col, 2005; Nakao y col., 2008), de marcadores de inflamación como ICAM-1 (Lo y col., 1993) o VCAM-1 (Lee y col., 2008) y de enzimas proinflamatorias como COX-2 (Adderley y Fitzgerald, 1999; Nakamura y Sakamoto, 2001; Cao y col., 2006). Por ello quisimos comprobar si el incremento inducido por IL-1β en los niveles de H_2O_2 estaba implicado en el aumento de la transcripción de COX-2 observado en CMLV de SHR. El tratamiento con catalasa, enzima que elimina H_2O_2, redujo la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β, sugiriendo que la expresión de COX-2 es dependiente de los niveles de esta ROS. Confirmando esta aseveración, la adición exógena de H_2O_2 a CMLV de SHR incrementó la transcripción de COX-2. El incremento en el estrés oxidativo derivado de una mayor activación de la NAD(P)Hox inducido por citoquinas como la IL-1β es capaz de activar factores de transcripción proinflamatorios como NFκB o AP-1 (Mendes y col., 2003; Li y col., 2006a) o MAPK como JNK (Lo y col., 1996) o p38MAPK (Robinson y col., 1999; Dean y col., 1999; Meloche y col., 2000), todos ellos elementos activadores de la transcripción de COX-2, lo que apoya la participación del incremento del estrés oxidativo en el aumento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1β en CMLV de SHR.

3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR PPAR EN CMLV

3.1. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR PPARγ

La relación entre la expresión de COX-2 y la activación de PPARγ es un hecho ampliamente documentado en distintos tipos celulares y tejidos, pero con resultados contradictorios. Las TZDs son ligandos de alta afinidad por PPARγ y comprenden una amplia familia de compuestos, entre los que destacan la pioglitazona y la rosiglitazona, las cuales han demostrado ser eficaces en el tratamiento de diabetes mellitus, aterosclerosis, hipercolesterolemia así como en distintos modelos de hipertensión asociada o no a patologías diabéticas (Willson y col., 1996; Tao y col., 2003; Staels y Fruchart, 2005; Dormandy y col., 2005; Estudio DREAM, 2006; Erdmann y col., 2007). A nivel del sistema nervioso central, el tratamiento con pioglitazona ha sido eficaz en la reducción de la expresión de COX-2 inducida por patología isquémica (Zhao y col., 2006; Collino y col., 2006). Además, el tratamiento con rosiglitazona reduce la expresión de COX-2 en un modelo de colitis ulcerosa inducida por ácido trinitrobenzensulfónico (Sánchez-Hidalgo y col., 2007). El efecto de la activación de PPARγ por pioglitazona parece ser específico del tejido o tipo celular en estudio, ya que a diferencia de lo observado en el sistema nervioso central, en la mucosa gástrica el tratamiento con pioglitazona no modifica la expresión de COX-2 (Konturek y col., 2003). En nuestro estudio, la activación de PPARγ por pioglitazona no modificó la expresión basal de COX-2 ni en CMLV procedentes de animales normotensos ni en las procedentes de animales hipertensos; sin embargo, redujo la transcripción de COX-2 inducida por IL-1β sólo en CMLV de SHR. Similares resultados se han obtenido por nuestro grupo al analizar la proteína (resultados no publicados), lo que confirma la existencia de la regulación de la expresión de COX-2 por PPARγ a nivel transcripcional.

De acuerdo con los mecanismos de transrepresión asociados a PPARγ, la reducción en la expresión de COX-2 tras la activación de este receptor nuclear podría deberse a la inhibición de factores de transcripción claves en la expresión de COX-2 y en la respuesta inflamatoria en general. La relación antagónica entre PPARγ y estos factores de transcripción ha sido descrita por varios grupos. Así, Matsumoto y col. (2007) observaron que el tratamiento con pioglitazona reducía la activación de AP-1 en aorta de ratas diabéticas de forma paralela a la inhibición de la NAD(P)Hox y a la mejora en las relajaciones dependientes de endotelio. En este mismo sentido, Diep y col. (2004b) observaron la misma relación entre la activación de PPARγ y la reducción de la activación de AP-1 y NFκB. Similares resultados obtuvieron Zingarelli y col. (2003) y Mendez y Lapointe (2003) tanto con 15d-PGJ_2 como con ciglitazona. Por el contrario, Kang y col. (2008) observaron que la activación con troglitazona incrementaba la expresión de COX-2 en CMLV de SHR y WKY aumentando los niveles de IκBα. De forma similar, Patel y col. (2005) en células epiteliales y He y col. (2006) en queratinocitos observaron un incremento en la expresión de COX-2 por troglitazona, aunque finalmente se demostró que este efecto era independiente de PPARγ. De ese modo, la modulación de la expresión de COX-2 en CMLV de SHR tras la activación de PPARγ por pioglitazona podría llevarse a cabo a través de la regulación del grado de activación de los factores de transcripción previamente comentados, ya que se ha descrito la reducción en la expresión de COX-2 por mecanismos que implican la inhibición de estos factores tras la activación de PPARγ (Subbaramaiah y col., 2001; Simonin y col., 2002; Sánchez-Hidalgo y col., 2007).

3.2. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 POR PPARα

Delerive y col. (1999a; 1999b; 2000) demostraron que no sólo PPARγ es capaz de bloquear la activación de NFκB y AP-1, sino que este efecto también puede ser mediado por PPARα, de tal manera que la activación de este receptor nuclear también podría desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión de enzimas proinflamatorias dependientes de estos factores de transcripción como COX-2. En nuestro estudio hemos encontrado que la regulación de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV de SHR es mediada específicamente por la isoforma γ, ya que la activación con fenofibrato de PPARα no modificó la expresión de COX-2 en CMLV de SHR e incluso incrementó la expresión de esta enzima en CMLV de WKY en presencia de IL-1β. De acuerdo con nuestros resultados, Blanco-Rivero y col. (2007) observaron en aortas de ratas Wistar tratadas con fenofibrato un incremento en la expresión de COX-2 y en la producción de PGE_2, al igual que una reducción en la de PGI_2, evento asociado al desarrollo de disfunción endotelial. La activación de la transcripción de COX-2 mediada por PPARα también fue observada por Oshio y col. (2008) en líneas celulares de colon humano utilizando ácidos biliares como activadores de la expresión de COX-2. Estos investigadores asociaron este efecto a mecanismos relacionados con el factor de transcripción CREB y no con NFκB, ya que la mutación de los sitios de unión de éste en el promotor de COX-2 no incrementó la expresión de COX-2 inducida por la activación de PPARα. Además, puesto que la activación transcripcional del promotor de COX-2 se inhibía tras la transfección con siRNA específicos para PPARα, estos autores concluyen que el efecto era mediado específicamente por esta isoforma. Sin embargo, aunque en nuestro estudio no se observara modificación de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV de SHR tratadas con fenofibrato, no se puede

descartar que la activación de PPARα ejerza otros efectos vasculares beneficiosos como la reducción de las alteraciones estructurales inducidas por angiotensina II o la propia IL-1β, ya que el tratamiento con agonistas de PPARα ha sido eficaz en la inhibición de la síntesis de ADN, de la adquisición del fenotipo hiperproliferativo e incluso de la migración celular en presencia de estos estímulos (Hu y col., 2002; Oshio y col., 2008).

Sin embargo, los datos que existen en relación con la regulación de la expresión de COX-2 por PPARα son contradictorios. Así, Staels y col. (1998a) en CMLV de aorta humana observaron que el incremento en la expresión de COX-2 inducido por IL-1β se reducía por la activación de PPARα y no de PPARγ. Este resultado, contrario al obtenido en nuestro estudio, difería también del obtenido por Hu y col. (2002) en cultivos de CMLV de aorta humana, donde tanto fenofibrato como 15d-PGJ_2 reducían la expresión de COX-2 inducida por angiotensina II, sugiriendo que la regulación de la expresión de COX-2 por PPARα es dependiente del estímulo. Además, la regulación de la expresión de COX-2 por PPARα también parece ser específica del tipo celular, ya que en líneas celulares de carcinoma de colon humanas la activación de PPARα redujo la expresión de COX-2 inducida por ésteres de forbol a través de la inhibición de la activación transcripcional mediada por AP-1 (Grau y col., 2006). Es interesante destacar que, al igual que lo que observamos con la expresión de PPARγ en CMLV de SHR, este efecto estaba relacionado con los niveles de expresión de PPARα (Grau y col., 2006). Además, Diep y col. (2002b) en arterias mesentéricas de ratas perfundidas con angiotensina II, observaron que el tratamiento con fenofibrato redujo la actividad de la NAD(P)Hox que, como se ha visto, es un importante modulador de la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2. Por su parte, Teissier y col. (2004), contribuyendo a la diversidad de resultados, observaron la capacidad del fenofibrato para activar la NAD(P)Hox y el estrés oxidativo en macrófagos, lo que sugiere que, de acuerdo con la íntima relación de la producción de ROS y la respuesta inflamatoria, PPARα podría estar contribuyendo al incremento del estrés oxidativo y, por tanto, a la activación de la respuesta inflamatoria.

La especificidad celular de la activación de PPARα se confirmó en la línea celular endotelial microvascular HMEC-1, en la cual la activación con fenofibrato incrementó la expresión basal de COX-2, efecto que no se observó en cultivos de CMLV de aorta de ratas normotensas e hipertensas. Sin embargo, la activación de PPARα en HMEC-1 redujo los niveles basales del ARNm de endotelina-1. En los estudios llevados a cabo por Delerive y col. (1999b), el tratamiento con fenofibrato inhibía la expresión de endotelina-1 inducida por trombina a través de mecanismos de transrepresión que implicaban la inhibición de la activación de AP-1. En relación con esto, nuestros resultados muestran que el fenofibrato a pesar de reducir la expresión de endotelina-1, incrementó tanto la expresión de COX-2 como la de c-Jun (resultados no publicados), sugiriendo que el incremento de la expresión de COX-2 en HMEC-1 inducido por fenofibrato se podría llevar a cabo a través de un mecanismo dependiente de AP-1. Aunque, *"a priori",* la mayor expresión de COX-2 se relaciona con patologías vasculares, la correcta funcionalidad del vaso no depende sólo de la síntesis de prostanoides vasoconstrictores sino también de la producción de prostanoides vasodilatadores, entre los cuales la PGI_2 juega un papel muy importante. Así, Bolego y col. (2006) observaron en HUVEC obtenidas de pacientes diabéticas una menor expresión de COX-2 que se correlacionaba con menores niveles de PGI_2 y, por lo tanto, con un incremento en las complicaciones

cardiovasculares asociadas a la patología diabética. Por lo tanto, no podemos descartar que el incremento en la expresión de COX-2 por el tratamiento con fenofibrato contribuya al incremento en los niveles de PGI_2 y, por tanto, a la mejora de las respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio descritas en distintas patologías vasculares. La reducción de la expresión de endotelina-1 y del marcador de inflamación endotelial VCAM-1 en HMEC-1 tratadas con fenofibrato (resultados no publicados) confirma que PPARα puede ejercer efectos beneficiosos a nivel vascular independientemente de la modulación de la expresión de COX-2 llevada a cabo por este receptor.

3.3. EFECTO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PPARγ SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN DE COX-2

Es importante determinar si, como se sugirió a partir de los resultados obtenidos en segmentos aórticos, en CMLV los niveles de expresión de PPARγ guardaban relación con la activación transcripcional de COX-2. Existen trabajos que relacionan una mayor expresión de PPARγ con un incremento en la actividad de COX-2. Así, Bishop-Bailey y col. (2003) describieron que el tratamiento con rosiglitazona incrementa tanto la expresión de COX-2 inducida por IL-1β como la producción de PGE_2 y PGD_2, efecto que se puede explicar por la existencia de un elemento de respuesta a PPAR en el extremo 5´ del promotor de COX-2 (Meade y col., 1999; Pontsler y col., 2002). Además, el hecho de que el inhibidor no específico de la COX indometacina, pero no los inhibidores expecíficos de COX-2, reduzca la transcripción de PPARγ inducida por rosiglitazona en CMLV de aorta permite descartar la posibilidad de que la expresión de PPARγ sea regulada a su vez por productos derivados de COX-2 (Bishop-Bailey y col., 2003). A pesar de estas observaciones controvertidas, y de acuerdo con la actividad antiinflamatoria a la que se han asociado estos receptores nucleares, se ha comprobado que la relación entre PPARγ y COX-2 es más bien antagónica. En este sentido, Inoue y col. (2000), de forma similar a lo observado en nuestro estudio en segmentos aórticos, demostraron en macrófagos la relación inversa entre la expresión de PPARγ y la de COX-2. En este mismo estudio, la capacidad de regulación negativa de la transcripción de COX-2 en BAECs se observó sólo tras la transfección con vectores que contenían PPARγ. Similares resultados fueron encontrados por Kapoor y col. (2007) en fibroblastos, donde el incremento en la expresión de COX-2 y PGE_2 inducido por IL-1β se correspondía con una disminución en los niveles de expresión de PPARγ; además, la activación por rosiglitazona reducía la expresión de COX-2. A su vez, Bren-Mattison y col. (2008) observaron que la sobreexpresión de PPARγ en células tumorales de pulmón reducía notablemente la expresión de COX-2. Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que la expresión de PPARγ contribuye negativamente a la regulación de la expresión de COX-2.

En CMLV de SHR en situación basal la expresión de PPARγ fue mayor que en WKY. Sin embargo, hay que destacar el hecho de que asociado a ese incremento en la expresión de PPARγ en CMLV de ratas hipertensas y, a diferencia de lo observado en segmentos aórticos de animales hipertensos, no se habían encontrado diferencias en la expresión de COX-2 en estas condiciones experimentales, sugiriendo que la mayor expresión de PPARγ en CMLV de SHR podría estar contribuyendo a evitar el incremento en la expresión de COX-2.

En la hipertensión, se encuentran elevados, además de los niveles de IL-1β y angiotensina II, los niveles de otras citoquinas como el TNFα, IL-6 (Sanz-Rosa y col., 2005a) o el TGF-β (Roson y col., 2008), las cuales se ha descrito pueden llevar a cabo su actividad proinflamatoria reduciendo los niveles de expresión de PPARγ. Así, el TNFα inhibe PPARγ por múltiples mecanismos, incluyendo la reducción de la expresión de este receptor nuclear tanto en adipocitos (Zhang y col., 1996) como en células hepáticas (Kim y col., 2007), efecto también observado en CMLV tratadas con TGF-β (Fu y col., 2003) y en adipocitos tratados con IL-6 (Lagathu y col., 2003). Sin embargo, también está descrito el efecto contrario, en el cual las citoquinas incrementan la expresión de PPARγ, probablemente con fines antiinflamatorios. Así, Xiong y col. (2004) en células mesangiales humanas y Fu y col. (2002) en CMLV de aorta humana describieron la capacidad de la IL-1β para incrementar la expresión de PPARγ. Por otro lado, la estimulación con INFγ en macrófagos, regula la expresión de PPARγ de modo bifásico, reduciendo sus niveles a tiempos cortos e incrementando la expresión de PPARγ a medida que transcurre el periodo de estimulación (Barish y col., 2005).

La estimulación de cultivos de CMLV con IL-1β incrementó la expresión de PPARγ en CMLV de SHR, mientras que no la modificó en WKY. El hecho de que en WKY la IL-1β no incrementase la expresión de PPARγ avala la hipótesis de que el incremento en la expresión de PPARγ observado en CMLV de ratas SHR podría ser en si mismo un mecanismo protector frente a la mayor respuesta inflamatoria y prooxidante inducida por la IL-1β en esta cepa. El grupo de Fu y col. (2002), trabajando en cultivos de CMLV humanos, observó que la angiotensina II y otras citoquinas, así como factores de crecimiento, incrementaban la expresión de PPARγ a modo de sistema de regulación negativa de la inflamación. Sin embargo, como se ha comentado previamente en segmentos aórticos, la angiotensina II contribuye a la reducción en la expresión del receptor como se deduce del incremento en la expresión de PPARγ tras el tratamiento con losartán. De ese modo, la menor expresión de PPARγ observada en segmentos aórticos de SHR sería fruto del balance neto entre los efectos ejercidos por la exposición crónica a distintas citoquinas y mediadores proinflamatorios, los cuales no están presentes en los cultivos de CMLV. Además, los efectos ejercidos por las distintas citoquinas y mediadores proinflamatorios pueden varían dependiendo de si estamos ante una exposición crónica o ante un tratamiento agudo. El incremento en la expresión de PPARγ observado con los tratamientos agudos sugiere que PPARγ actúa como un mecanismo protector, cuya función es bloquear las acciones proinflamatorias ejercidas por distintas citoquinas; sin embargo, la reducción en la expresión de PPARγ en segmentos aórticos de animales hipertensos debidos a la exposición crónica *"in vivo"* supondría la inhibición de estos mecanismos protectores y, por lo tanto, el incremento en la expresión de marcadores de inflamación como COX-2.

Con el fin de apoyar la hipótesis de que el incremento en la expresión de PPARγ en CMLV de SHR puede ser un mecanismo para reducir la mayor actividad transcripcional de COX-2 inducida por IL-1β, se transfectaron CMLV de SHR estimuladas con IL-1β con un ARN de interferencia específico para PPARγ y observamos que la reducción de la expresión de PPARγ tuvo como efecto un incremento en la transcripción de COX-2, confirmando la relación negativa entre los niveles de expresión de este receptor nuclear y los de COX-2. Estos resultados indican que los niveles de expresión de PPARγ son importantes en la regulación de la transcripción de COX-2, y ayudarían a explicar la mayor expresión a nivel basal de COX-2 en segmentos

aórticos de SHR. A partir de lo observado en cultivos de CMLV, se puede proponer que el incremento en la expresión de PPARγ es un mecanismo celular represor de la expresión de COX-2 y de la respuesta inflamatoria a nivel vascular.

Existen diversos estudios que describen la capacidad de las TZDs para inducir la expresión del propio receptor. Así, Liu y col. (2005) observaron en pulmón de rata que de forma asociada a su actividad antiinflamatoria, la activación de PPARγ con rosiglitazona incrementó la expresión del propio receptor nuclear. Similares resultados obtuvieron Sommer y Wolf (2007), los cuales también observaron que el tratamiento con rosiglitazona y sus efectos antioxidantes se relacionaban con un incremento en la expresión del propio receptor. Puesto que los niveles de expresión de PPARγ son importantes en la regulación de la expresión de COX-2, la inhibición de la expresión de esta enzima inducida por IL-1β tras el tratamiento con pioglitazona en CMLV de SHR podría deberse a un incremento en la expresión de PPARγ. Así, se comprobó que, efectivamente, la activación con pioglitazona incrementó la expresión de PPARγ inducida por IL-1β sólo en CMLV de SHR, confirmando que los niveles de expresión de PPARγ son fundamentales para su actividad antiinflamatoria y contribuyen a explicar el efecto de la activación de PPARγ sobre la expresión de COX-2 inducida por IL-1β.

3.4. LA ACTIVACIÓN DE PPARγ INHIBE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IL-1β A TRAVÉS DE LA REDUCCIÓN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha discutido con anterioridad, el estrés oxidativo, y concretamente el $O_2^{\cdot-}$ derivado de la NAD(P)Hox, contribuye al aumento de la expresión de COX-2 en CMLV de SHR estimuladas con IL-1β, como se deduce de la inducción de la expresión de NOX-1 y del incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ tras el tratamiento con IL-1β, así como de la inhibición por apocinina de la inducción de COX-2 en presencia de esta citoquina. Puesto que se han descrito acciones antioxidantes asociadas la activación de PPARγ, nos planteamos si la regulación de COX-2 por este receptor nuclear podía llevarse a cabo a este nivel. Así, Chen y col. (2004) observaron en fibroblastos cardiacos que la activación de PPARγ redujo la síntesis de procolágeno I inducida por angiotensina II de forma dependiente a la reducción de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y del nivel de activación de NFκB inducido por este péptido. Interesantemente, el cotratamiento con estatinas potenció este efecto (Chen y Mehta, 2006), de acuerdo con la capacidad descrita para estos fármacos de ejercer su actividad a través de los PPARs (Han y col., 2005b; Yano y col., 2007). En células endoteliales estimuladas con LDLs oxidadas, angiotensina II y TNFα (Mehta y col., 2003) y en CMLV tratadas con insulina (El Midaoui y col., 2006) se ha observado que la activación de PPARγ también es responsable de la reducción de los niveles de $O_2^{\cdot-}$. Además, Nakamura y col. (2007) observaron en ratas hipertensas que la pioglitazona reducía la producción de $O_2^{\cdot-}$ generado por la NAD(P)H oxidasa a nivel cerebrovascular. Muchos de los efectos antioxidantes descritos asociados a la activación de PPARγ están relacionados con la regulación de la expresión de distintas subunidades de la NAD(P)Hox. Así, además de la inhibición de la expresión de p22phox y p67phox por pioglitazona descrita en fibroblastos por Chen y Mehta (2006), el tratamiento con rosiglitazona también 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 $O_2^{\cdot-}$ (Hwang y col., 2007). Asimismo, en HUVEC la activación de PPARγ reduce tanto la expresión de las subunidades de la NAD(P)Hox NOX-1,

NOX-2 y NOX-4 como la producción de $O_2^{\cdot-}$, sin modificar la expresión de otra fuente vascular de $O_2^{\cdot-}$ como la xantina oxidasa, sugiriendo que el efecto antioxidante de PPARγ podría ser mediado principalmente a través de la inhibición de la NAD(P)Hox (Hwang y col., 2005).

Con estos antecedentes, nos planteamos si la reducción de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β tras la activación de PPARγ en CMLV de SHR se podía deber, además de al incremento en la expresión del propio receptor nuclear y a la posible activación de mecanismos de transrepresión, a la reducción del estrés oxidativo. Efectivamente, el tratamiento con pioglitazona redujo el incremento en la expresión de NOX-1 inducida por IL-1β en CMLV de SHR, sin modificar dicha expresión en WKY. Además, el tratamiento con pioglitazona redujo la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLV de SHR estimuladas con IL-1β, sugiriendo que la activación de PPARγ, a través de la inhibición de la transcripción de NOX-1 reduce la producción de $O_2^{\cdot-}$. Estos resultados otorgan a la activación de PPARγ un papel antioxidante que podría contribuir a la reducción de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β, puesto que como habíamos comprobado, esta ROS estaba implicada en su inducción.

Puesto que la pioglitazona incrementó la expresión de PPARγ en CMLV de SHR, no se podía descartar que la reducción en la producción de $O_2^{\cdot-}$ por la activación de este receptor nuclear se debiera al incremento en los niveles de expresión de PPARγ y a la activación de mecanismos de transrepresión sobre los factores de transcripción implicados en la expresión de NOX-1. Nuestros resultados muestran que la reducción de la expresión de PPARγ por ARN de interferencia incrementó la transcripción de NOX-1 y sugieren que, igual que sucedía con COX-2, los niveles de expresión de PPARγ en CMLV de SHR estimulados con IL-1β son importantes para llevar a cabo su actividad antioxidante. De ese modo, el incremento en la expresión de PPARγ por pioglitazona en presencia de IL-1β en CMLV de SHR contribuiría a la reducción de la expresión de NOX-1, debido probablemente a su capacidad para bloquear las rutas activadoras de la transcripción de NOX-1, y reduciría en consecuencia la producción de $O_2^{\cdot-}$ y, por tanto, la expresión de COX-2 inducida por IL-1β.

4. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES POR PPARγ

La alta actividad celular inducida por las ROS requiere una estrecha regulación en sus niveles, lo que implica que, además de la modulación de las fuentes enzimáticas encargadas de su producción, sea clave la activación de mecanismos protectores para su eliminación. En este trabajo hemos demostrado que el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 derivado de la actividad de la NAD(P)Hox son ROS moduladoras de la expresión de COX-2. Sus niveles y, por lo tanto, su participación en la expresión de esta enzima no sólo dependerán de su tasa de producción, sino también de la capacidad de los sistemas detoxificantes de llevar a cabo su eliminación.

Las principales enzimas detoxificantes de ROS son las SODs, la glutatión peroxidasa o la catalasa. Así, las SODs son las enzimas encargadas de reducir los niveles de $O_2^{\cdot-}$, dismutándolo y generando H_2O_2. Existen 3 isoformas de esta enzima, SOD-1, SOD-2 y SOD-3, que presentan distinta localización celular, lo que sugiere que su actividad es específica del compartimento donde se lleva a cabo. Las distintas isoformas de SOD presentan en su centro catalítico distintos metales cuya función es clave para su papel detoxificante. La SOD-1 (Cu/Zn-SOD) contiene un núcleo de Cu/Zn y es citosólica, la SOD-2 (Mn^{2+}-SOD)

contiene un núcleo de Mn^{2+}, y es mitocondrial y la SOD-3 o Ec-SOD, que al igual que la SOD-1 contiene un núcleo de Cu/Zn, está orientada hacia el espacio extracelular (Faraci y Didion, 2004; Wassman y col., 2004; Johnson y Giulivi, 2005).

La relación entre el estrés oxidativo y la capacidad detoxificante celular llevada a cabo por estas enzimas está ampliamente descrita. Lin y col. (2005) mostraron la importancia de los niveles de expresión de SOD-1 en el aumento del estrés oxidativo al observar que la sobreexpresión de esta enzima en células endoteliales estimuladas con TNFα reducía la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la expresión de marcadores de inflamación como ICAM-1 o VCAM-1. Por su parte, Shi y col. (2004) demostraron que la activación de JNK y p38MAPK en CMLV estimuladas con EGF era menor cuando se sobreexpresaba la SOD-1, confirmando la relación entre los niveles de expresión de enzimas detoxificantes y la reducción en la activación de rutas de señalización implicadas en el estrés celular.

Existen varios estudios que avalan la hipótesis de la implicación de una reducción en los niveles de los enzimas detoxificantes con el incremento en el estrés oxidativo observado en la hipertensión. Así, Tanaka y col. (2005) observaron, en ratas hipertensas SHR-SP, que la reducción en el estrés oxidativo por la inhibición de los receptores AT-1 o de la ECA era mediada tanto por la reducción de la expresión de la NAD(P)Hox como por el incremento en la expresión de la SOD-1. Similares resultados fueron encontrados por Umemoto y col. (2004) utilizando el antagonista de calcio amlodipino. Por su parte, Chaves y col. (2007) en células mononucleares de pacientes hipertensos confirmaron la relación entre el incremento del estrés oxidativo observado en la hipertensión y la reducción en la expresión de enzimas detoxificantes citoplasmáticas como la SOD-1. Nozoe y col. (2007) encontraron que la expresión de la SOD-1 en el núcleo del tracto solitario era menor en ratas SHR-SP que en sus controles normotensos. Por otra parte, Wu y col. (2001) tanto en el modelo de hipertensión de ratas DOCA-"*salt*" como en ratas SHR encontraron mayores niveles de $O_2^{\cdot-}$ derivados de una mayor actividad de la NAD(P)Hox; sin embargo, sólo en aortas procedentes de ratas DOCA-"*salt*" existía una relación clara entre el incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la reducción en la expresión de SOD-1, sugiriendo que el impacto de la alteración en los mecanismos detoxificantes sobre el estrés oxidativo es dependiente también del modelo de hipertensión en estudio. En nuestro trabajo hemos observado que la expresión basal de SOD-1 era menor en CMLV de SHR, confirmando la hipótesis de que la reducción en los mecanismos antioxidantes junto al incremento en la expresión de NOX-1, constituyen dos mecanismos cuyo efecto neto sería el incremento del estrés oxidativo asociado a la hipertensión.

Las citoquinas ejercen su actividad prooxidante por su capacidad no sólo de incrementar la expresión de proteínas generadoras de ROS, sino también debido a la modulación de la expresión de los sistemas detoxificantes celulares. Teniendo en cuenta el incremento en el estrés oxidativo inducido por la IL-1β encontrado en CMLV de SHR y la observación de que la expresión de la SOD-1 se reducía en condrocitos estimulados con IL-1β (Mathy-Hartet y col., 2008), era posible que, al menos parte del efecto prooxidante ejercido por esta citoquina en CMLV de SHR se debiera a la reducción en la expresión de la SOD-1. Sin embargo, el efecto de IL-1β sobre la expresión de SOD-1 que observamos en nuestro estudio fue el contrario. Así, el incremento en el estrés oxidativo derivado de la mayor actividad de la NAD(P)Hox se vio acompañado de un incremento en la expresión de la SOD-1 sólo en CMLV de SHR. Resultados similares fueron obtenidos por Sharma y col. (2007) en astrocitos, donde el incremento en el estrés oxidativo inducido

por IL-1β se acompañaba de un incremento en la expresión de SOD-1, potenciándose el efecto antioxidante tras el tratamiento con flavonoides. El incremento en la expresión de SOD-1 no es un efecto exclusivo de la exposición a IL-1β, ya que se ha observado también con otros estímulos proinflamatorios y prooxidantes como LPS o TNFα (Marikovsky y col., 2003), probablemente como mecanismo compensador frente al incremento en el estrés oxidativo. Hernanz y col. (2004) en arterias cerebrales de rata describieron que el incremento en la expresión de COX-2 inducido por LPS tras 5 horas de incubación en KHS era acompañado de la inducción de la expresión tanto de SOD-1 como de SOD-2. Es probable que el anión superóxido active sus propios mecanismos de eliminación incrementando la expresión de las SODs como medida protectora antioxidante. De acuerdo con esta hipótesis, el tratamiento con el inhibidor de la NAD(P)Hox apocinina redujo el incremento en la expresión de SOD-1 inducida por IL-1β, confirmando la existencia de una relación directa entre el incremento en el estrés oxidativo y la inducción de enzimas implicadas en procesos de detoxificación como mecanismo protector frente al propio estrés oxidativo en ratas SHR.

La dismutación de anión superóxido puede ser llevada a cabo por otras isoformas de la SOD, como la SOD-2. No se observaron diferencias en los niveles basales de ARNm de dicha isoforma entre CMLV de WKY y SHR, aunque de manera similar a lo observado con la isoforma citoplasmática, la IL-1β indujo la expresión del ARNm de la SOD-2 sólo en cultivos de CMLV procedentes de ratas hipertensas. Otros investigadores han descrito que citoquinas como la IL-1β o el TNFα son capaces de incrementar la expresión de la SOD-2 (Valentine y col., 1996; Jones y col., 1997; Rogers y col., 2001). Como ya se ha comentado, NFκB incrementa su grado de activación en presencia de ROS (Bowie y O´Neill, 2000; Li y Engelhardt, 2006). La SOD-2 tiene una secuencia intrónica con características de "*enhancer*" que presenta sitios de unión tanto para C/EBP como para NFκB (Jones y col., 1997), lo que permite relacionar la inducción de esta enzima con la activación de NFκB y, por lo tanto, con el incremento en el estrés oxidativo. Puesto que la IL-1β incrementa la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLV de ratas SHR, la inducción de la expresión de la SOD-2 parecería un efecto lógico. Sin embargo, el hecho de que la respectiva inhibición de la NAD(P)Hox y la xantina oxidasa por el tratamiento con apocinina y alopurinol no redujera la transcripción de SOD-2 inducida por IL-1β, sugiere que en nuestras condiciones experimentales y, al contrario de lo que sucedía con la SOD-1, esta inducción era independiente de la producción de $O_2^{\cdot-}$. De acuerdo con nuestros resultados, Jones y col. (1997) demostraron que aunque la región 3´ del elemento de respuesta a citoquinas en el promotor de la SOD-2 es la que presenta los sitios de unión para c/EBP y NFκB, la activación de esta región no es imprescindible para la activación del promotor de SOD-2, lo que permite explicar que la probable activación de NFκB inducida por el estrés oxidativo no contribuya al incremento en la expresión de esta enzima. Por otra parte, Rogers y col. (2001) demostraron que el bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial reducía la expresión de SOD-2 inducida por TNFα, sugiriendo la implicación del anión superóxido generado a nivel mitocondrial en la expresión de la SOD-2. Debido a que la SOD-2 es de localización mitocondrial, parece lógico pensar que su función estaría más dirigida a la eliminación del $O_2^{\cdot-}$ generado en la cadena de transporte electrónico, ya que el $O_2^{\cdot-}$ es una molécula cargada y no puede atravesar libremente las membranas celulares. En vista de los estudios discutidos y de los resultados obtenidos en los cuales la IL-1β incrementaba de la expresión de la SOD-2 en CMLV de SHR, se requieren más experimentos para dilucidar si esta citoquina podría estar mediando sus efectos también a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial.

Como ya se ha comentado, en CMLV de SHR el tratamiento con pioglitazona reducía la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por IL-1β. Este efecto podía deberse a la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes como NOX-1 que hemos encontrado. Sin embargo, el efecto de la pioglitazona sobre producción de ROS también puede deberse a un incremento en la expresión de las SODs. En este sentido, Tureyen y col. (2007) describieron que la activación de PPARγ con rosiglitazona incrementaba la expresión de SOD-1 tanto en ratas SHR como en ratas diabéticas sometidas a oclusión de la arteria cerebral media, mejorando la respuesta antiinflamatoria a nivel del sistema nervioso central. Por su parte, Yi y col. (2008) observaron que el tratamiento con rosiglitazona de ratones con daño cerebral inducido por trauma craneal incrementaba la expresión de ambas isoformas de SODs, además de la del propio receptor nuclear. En nuestro modelo, la activación de PPARγ aumentó la expresión basal de SOD-1 en CMLV de SHR, sin modificar dicha expresión en presencia de IL-1β. Puesto que la pioglitazona inhibió la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por IL-1β y dicha ROS activa la expresión de la SOD-1, la existencia de un balance entre la posible activación transcripcional de SOD-1 mediada por este receptor nuclear y la reducción de la expresión de esta enzima detoxificante por la acción antioxidante mediada por PPARγ explicaría que la transcripción de la SOD-1 en presencia de IL-1β no se modifique significativamente con el tratamiento.

La relación entre los niveles de expresión de PPARγ y la expresión de SOD-2 también ha sido documentada. Ding y col. (2007) observaron que el corazón de ratones que no expresaban PPARγ presentaba una menor expresión de SOD-2 y una mayor producción de $O_2^{\cdot-}$, concluyendo tras analizar el promotor de esta enzima, que la SOD-2 podía ser un gen regulado por PPARγ y que, por lo tanto, PPARγ podía reducir el estrés oxidativo activando la transcripción de esta enzima detoxificante. De acuerdo con esto, Yi y col. (2008) observaron que el tratamiento con rosiglitazona a nivel del sistema nervioso central en ratones C57BL/6 con inflamación inducida por perfusión con CCl_4 incrementaba la expresión de SOD-2. Sin embargo, en CMLV de SHR la expresión de SOD-2 no se modificó por el tratamiento con pioglitazona, a pesar del incremento en la expresión de PPARγ observado en estas células, e incluso la redujo en CMLV de WKY. Previamente hemos mostrado que la reducción de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ a través de la inhibición de sus principales fuentes vasculares NAD(P)Hox y xantina oxidasa no alteró la expresión de la SOD-2. Por tanto, nuestros resultados indican que la expresión de SOD-2 es independiente de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y que las acciones antioxidantes ejercidas por PPARγ no se deben al incremento en la expresión de esta isoforma en ninguna de las dos cepas estudiadas.

La eliminación de $O_2^{\cdot-}$ por las SODs lleva implícita en su actividad enzimática un incremento en la producción de H_2O_2 (Nordberg y Arner, 2001; Johnson y Giulivi, 2005). Así, ratones que carecen de la expresión de la SOD-1 presentan una menor producción endotelial de H_2O_2 (Morikawa y col., 2003). De acuerdo con ésto, Yin y col. (2007) observaron que el tratamiento con LDLs oxidadas de CMLV de aorta, al igual que en nuestro estudio tras el tratamiento con IL-1β, incrementaba la producción de H_2O_2 por un mecanismo dependiente del incremento en la expresión y actividad de la SOD-1 y del aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ derivado de la subunidad NOX-1 de la NAD(P)Hox. Similares resultados fueron obtenidos por Zafari y col. (1998) en CMLV estimuladas con angiotensina II donde el H_2O_2 derivado directamente de la actividad de la NAD(P)Hox estaba también implicado en la hipertrofia celular inducida por este péptido. Como se ha comentado previamente, la IL-1β contribuye al incremento en el estrés oxidativo y al estado inflamatorio generando, además de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2. El hecho de que en nuestro estudio la

IL-1β induzca en CMLV de SHR tanto la expresión de SOD-1 y de SOD-2, como la generación de su sustrato, el $O_2^{\cdot-}$, sugiere que el incremento en la producción de H_2O_2 se podría deber al incremento en la expresión y/o actividad de estas enzimas, pero también a la reducción de la catalasa, enzima encargada de eliminar esta ROS.

La catalasa es una enzima que transforma el H_2O_2 en especies no tóxicas para la célula como agua y oxígeno molecular. Brown y col. (1999) confirmaron la importancia de esta ROS en el fenotipo hiperproliferativo de CMLV a partir de la observación de que la sobreexpresión de la catalasa en CMLV de rata inhibía la proliferación celular, activando mecanismos de apoptosis. Similares resultados fueron encontrados por Zafari y col. (1998). Sin embargo, en contraposición a esto, Li y col. (1997) demostraron que el H_2O_2 es un potente activador de apoptosis, lo que sugiere que el posible papel de esta enzima en la regulación del ciclo celular no está aún muy claro. A pesar de que se asocia un incremento en la producción de ROS con el desarrollo de la hipertensión, no existe un acuerdo absoluto entre la relación de la expresión de la catalasa y esta patología vascular. Así, Chan y col. (2006) han descrito que asociado al incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en ratas SHR, se observaba una reducción tanto en la expresión como en la actividad de la catalasa. Sin embargo, en túbulos renales de ratas SHR, de acuerdo con el mayor estado inflamatorio, y en contra de lo esperado, la expresión de la catalasa fue mayor que en WKY (Kumar y col., 2005). En nuestro estudio no se observaron diferencias en la expresión basal de catalasa entre CMLV de SHR y WKY, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Ulker y col. (2003) en segmentos aórticos de ratas SHR.

Al igual que sucedía con las SODs, distintas citoquinas son capaces de modular la expresión de la catalasa. Así, el TGF-β, por ejemplo, lleva a cabo su actividad mitogénica en CMLV a través de la reducción de la actividad de la catalasa (Nishio y Watanabe, 1997). Adicionalmente, confirmando el papel antioxidante y antiinflamatorio de esta enzima, Lupertz y col. (2008) comprobaron que la sobreexpresión de catalasa en células MCF-7 reducía la activación de NFκB mediada por la producción de H_2O_2 inducida por TNFα. En nuestro estudio hemos observado que la IL-1β incrementa la expresión de catalasa en CMLV de SHR sin modificar su expresión en WKY. De forma similar, Csonka y col. (2000) describieron en corazones de ratas SHR perfundidas con H_2O_2 que esta ROS incrementaba la expresión de catalasa. Por ello, estudiamos si las ROS generadas tras la estimulación con IL-1β modulaban la expresión de catalasa. Efectivamente, la adición exógena de H_2O_2 a CMLV de SHR incrementó la expresión de catalasa, y el tratamiento con catalasa exógena en presencia de IL-1β redujo la expresión de la enzima celular, confirmando la regulación de la expresión de catalasa por el propio estimulo prooxidante, probablemente, con fines antioxidantes. Además, la reducción en la expresión de catalasa en CMLV de SHR tratadas con apocinina sugiere que el incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducido por IL-1β contribuye al incremento en la expresión de esta enzima detoxificante. Puesto que el $O_2^{\cdot-}$, por la acción detoxificante de la SOD-1, es transformado en H_2O_2, cabe la posibilidade que el incremento en la expresión de esta enzima y el aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ derivados del incremento en la subunidad NOX-1 de la NAD(P)Hox inducido por la IL-1β en CMLV de SHR sea responsable del incremento en los niveles de H_2O_2 y, por lo tanto, del aumento en la expresión de catalasa.

En nuestro estudio la activación de PPARγ en CMLV de SHR redujo los niveles de H_2O_2 inducidos por IL-1β, debido probablemente a la ya mencionada reducción de la expresión de NOX-1 y de la producción de

$O_2^{\cdot-}$ por el tratamiento con pioglitazona. Sin embargo, la reducción en los niveles de H_2O_2 tras la activación de PPARγ también podría deberse al incremento en la expresión y/o actividad de la catalasa. En este sentido Yi y col. (2008) demostraron que el tratamiento con rosiglitazona reducía el estrés oxidativo y el estado inflamatorio a nivel del sistema nervioso central aumentando la expresión de la catalasa además de las SODs. En nuestro estudio, la activación de PPARγ por pioglitazona en presencia de IL-1β no modificó la expresión de catalasa en CMLV de ninguna de las dos cepas. Siguiendo el mismo razonamiento que se utilizó para la SOD-1 y la regulación de su expresión por las ROS, puesto que el tratamiento con pioglitazona redujo los niveles de H_2O_2 inducidos por IL-1β en CMLV de SHR y que éstos están implicados en la expresión de la catalasa, la activación transcripcional de esta enzima debería reducirse al activar PPARγ. Sin embargo, la existencia de un elemento de respuesta a PPAR en el promotor murino de la catalasa descrita por Girnun y col. (2002) indica que la expresión de esta enzima podría ser, a su vez, regulada positivamente por PPARγ. De acuerdo con esto, la inhibición de la expresión de catalasa inducida por IL-1β observada en CMLV de SHR tras reducir la expresión de PPARγ con un ARN de interferencia específico para este receptor nuclear confirmó la implicación de PPARγ en la expresión de esta enzima. Puesto que el tratamiento con pioglitazona, además de incrementar la expresión de PPARγ, redujo los niveles de H_2O_2, estímulo inductor de la expresión de catalasa, estamos de nuevo ante un balance entre dos efectos ejercidos por la activación de un mismo receptor que no permite observar un efecto neto significativo pero, si que sugiere que la contribución de PPARγ a la reducción del estrés oxidativo inducido por estímulos proinflamatorios es fundamental frente a la inflamación vascular.

Puesto que PPARγ activa la transcripción de catalasa y ésta, a su vez, es regulada por los niveles de H_2O_2 nos planteamos si el incremento en los niveles de H_2O_2 inducido por IL-1β en CMLV de SHR podía inducir la expresión de catalasa a través del incremento de la expresión de PPARγ. Efectivamente, la adición exógena de H_2O_2 incrementó la expresión de PPARγ, y el tratamiento con catalasa exógena, pero no con apocinina, redujo la expresión de este receptor nuclear, sugiriendo que el incremento en la expresión de catalasa podría ser mediada por el aumento en la expresión de PPARγ inducido por el incremento en los niveles de H_2O_2 inducido por IL-1β.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. Con la hipertensión existe un incremento en la expresión vascular de la enzima proinflamatoria COX-2 asociado a la mayor actividad del sistema renina-angiotensina. La angiotensina II contribuye a dicho incremento a través de la activación de los receptores AT-1.

2. El incremento de la expresión de COX-2 inducido por angiotensina II se asocia con el incremento en el estrés oxidativo, como consecuencia de la inducción de la expresión de la subunidad catalítica de la NAD(P)Hox NOX-1, y, probablemente, del aumento en la actividad de este complejo enzimático.

3. En la hipertensión la expresión vascular de PPARγ, pero no de PPARα, está reducida. El incremento en la activación del RAS contribuye a la reducción de la expresión de PPARγ observada en esta patología vascular. Los menores niveles de expresión de PPARγ podrían estar implicados en el incremento de la expresión de COX-2 previamente descrito.

4. De acuerdo con el estado inflamatorio vascular asociado a la hipertensión, el incremento en la transcripción de COX-2 inducido por mediadores proinflamatorios como IL-1β es mayor en CMLV de animales hipertensos.

5. La inflamación vascular contribuye al incremento en el estrés oxidativo descrito en la hipertensión. Así, la exposición de CMLV procedentes de animales hipertensos a IL-1β incrementa los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2, como consecuencia del incremento en la expresión de NOX-1 y/o en la actividad de la NAD(P)Hox. Estas especies reactivas de oxígeno contribuyen a la inducción de COX-2 en CMLV de animales hipertensos.

6. El estrés oxidativo inducido por la IL-1β en CMLV de animales hipertensos también activa mecanismos antioxidantes como la expresión de enzimas detoxificantes, incluyendo las SODs o la catalasa.

7. La activación de PPARγ, pero no de PPARα, induce su propia expresión y reduce la expresión de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV de ratas SHR por inhibición de la transcripción de NOX-1 y, por consiguiente, por la reducción de los niveles de ROS derivados de la NAD(P)Hox.

8. La IL-1β induce la expresión de PPARγ en CMLV de animales hipertensos por un mecanismo dependiente de la producción de H_2O_2. El aumento en la expresión de PPARγ constituye un mecanismo antioxidante y antiinflamatorio endógeno implicado en la inducción de enzimas detoxificantes como la catalasa y en la inhibición de la expresión de enzimas prooxidantes como NOX-1 y, por tanto, explicaría la inhibición de la expresión de COX-2 inducida por citoquinas proinflamatorias tras la activación de dicho receptor.

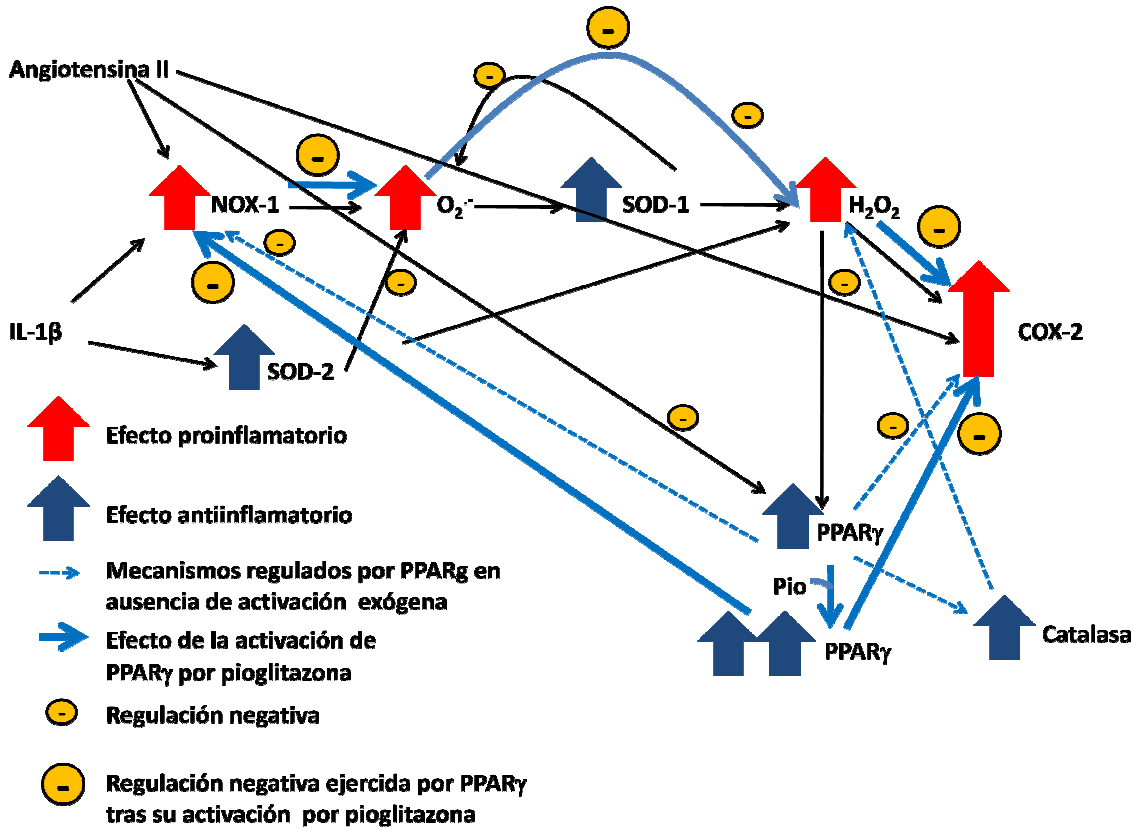


Fig. 95: Mecanismo propuesto para explicar la regulación negativa de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β en CMLV SHR tras la activación de PPARγ. La IL-1β incrementa la producción de $O_2^{\cdot-}$ por mecanismos que implican la inducción de NOX-1. El aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ inducido por la citoquina activa mecanismos detoxificantes como el incremento en la expresión de las SODs. El incremento en la expresión de las SODs inducido por IL-1β está implicado en el aumento en los niveles de H_2O_2 inducido por la citoquina. Este incremento en el estrés oxidativo contribuye a la inducción de la expresión de COX-2 por IL-1β. Sin embargo, el H_2O_2 también induce la expresión de PPARγ. Este aumento en la expresión de PPARγ es un mecanismo endógeno antioxidante y antiinflamatorio ante el incremento del estrés oxidativo contribuyendo a la reducción de la expresión de NOX-1 y de la producción de ROS y, por lo tanto, a la inhibición de la expresión de COX-2 inducida por IL-1β. Además, el incremento en la expresión de PPARγ incrementa la expresión de catalasa, la cual contribuye a reducir los niveles de H_2O_2 y, por tanto, a reducir la expresión de COX-2. La activación de PPARγ por pioglitazona incrementa la expresión del propio receptor y potencia todos los efectos mencionados previamente, reduciendo el estrés oxidativo inducido por IL-1β y, por consiguiente, la expresión de COX-2. La angiotensina II circulante reduce la expresión PPARγ y, por lo tanto, reduce este mecanismo antiinflamatorio celular contribuyendo al incremento en el estrés oxidativo y a la mayor expresión de COX-2 descrita en la hipertensión. COX-2: ciclooxigenasa-2, IL-1β: interleuquina 1β, Pio: pioglitazona, PPARγ: receptor activador de la proliferación peroxisomal γ, SOD-1: superóxido dismutasa-1, SOD-2: superóxido dismutasa-2.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que PPARγ desempeña un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria vascular. Los efectos observados con el activador de PPARγ pioglitazona en CMLV de 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. Como hemos mostrado, el incremento en la activación del RAS observado en ratas SHR está implicado en la reducción de los niveles de PPARγ observada en esta cepa. Los menores niveles de expresión de este receptor nuclear suponen una reducción en un mecanismo endógeno protector frente al incremento en el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria vascular inducida por los elevados niveles de citoquinas proinflamatorias descritos en la hipertensión. Además, el aumento en la expresión de COX-2 asociado a los menores niveles de PPARγ en ratas SHR mostrado en este estudio podría ayudar a explicar algunas de las alteraciones funcionales y estructurales descritas en la patología hipertensiva.

1. In hypertension there is an increase in the vascular expression of the proinflammatory enzyme COX-2 associated to the higher rein-angiotensin system activity. Angiotensin II contributes to this increase through to the activation of AT-1 receptors.

2. The increase in COX-2 expression induced by angiotensina II is associated to the increase in the oxidative stress, as a consequence of the induction of the catalytic subunit of NAD(P)Hox NOX-1 and, probably due to the increase in the activity of this enzymatic complex.

3. In hypertension PPARγ, but not PPARα, expression is reduced. The increase in RAS activity contributes to the reduction of PPARγ expression observed in this vascular pathology. The lower PPARγ expression levels could be involved in the increase in COX-2 expression previously described.

4. According to the vascular inflammatory state associated to hypertension, the increase in COX-2 transcription induced by proinflammatory mediators such as IL-1β is higher in VSMC from hypertensive animals.

5. Vascular inflammation contributes to the increase in oxidative stress described in hypertension. Thus, the exposure of VSMC from SHR rats to IL-1β increases the $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 levels as a consequence to the increase in NOX-1 expression and/or in the NAD(P)Hox activity. These ROS contributes to COX-2 induction in hypertensive animals.

6. The oxidative stress induced by IL-1β in VSMC from hypertensive animals also activates antioxidant mechanisms such as the expression of detoxificant enzymes, including SODs or catalase.

7. PPARγ activation, but not PPARα, induces its own expression and reduces COX-2 expression induced by IL-1β in VSMC from SHR rats through to the inhibition of NOX-1 transcription and, therefore, to the reduction of ROS levels derived from NAD(P)Hox.

8. IL-1β induces PPARγ expression in VSMC from hypertensive animals by a H_2O_2 dependent pathway. The increase in the expression of PPARγ constitutes an endogenous antioxidant and anti-inflammatory mechanism involved in the induction of detoxificant enzymes such as catalase as well as in the inhibition of the expression of prooxidant enzymes like NOX-1. This would explain the inhibition of COX-2 expression after PPARγ activation.

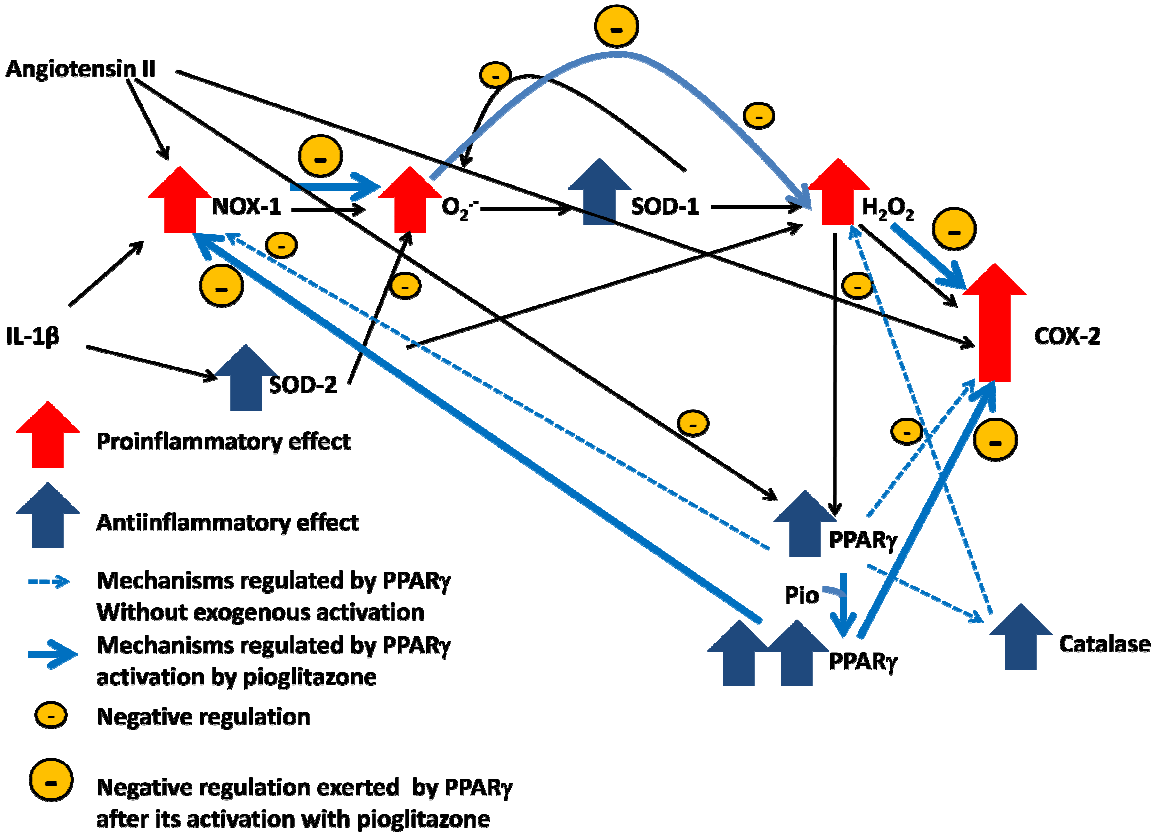


Fig. 96: Mechanism proposed to explain the negative regulation of IL-1β-induced COX-2 expression after PPARγ activation. IL-1β increases $O_2^{\cdot-}$ production through mechanisms involving NOX-1 induction.The increase in $O_2^{\cdot-}$ levels by the cytokine activates detoxificant mechanisms such as the increase in SOD expression. The increase in SOD expression is involved in the increase in H_2O_2 leves induced by IL-1β. The induction of COX-2 expression by IL-1β is dependent of the oxidative stress induced by the cytokine. However, the H_2O_2 levels induced by IL-1β also increases PPARγ. This increase in PPARγ expression is an endogenous antioxidant and antiinflammatory mechanism opposite to the oxidative stress which contributes to the reduction of NOX-1 expresión and ROS generation induced by IL-1β and would reduce COX-2 expression. In addition, the increase in PPARγ by the oxidative stress induced by the cytokine increases the catalase transcription, wich contributes to reduce the H_2O_2 levels and, furthermore, to inhibit the COX-2 expression. The PPARγ activation by pioglitazone increases its own expression and enhances all the effects previously mentioned, reducing the oxidative stress induced by IL-1β and, furthermore, the COX-2 expression. The circulating angiotensin II reduces PPARγ and, furthermore, reduces this cellular antiinflammatory mechanism contributing to the increase in the oxidative stress and to the higher COX-2 expression described in hypertension. COX-2: cyclooxygenase-2, IL-1β: interleukin 1β, Pio: pioglitazone, PPARγ: peroxisome proliferator receptor γ, SOD-1: superoxide dismutase-1, SOD-2: superoxide dismutase-2.

MAIN CONCLUSION

In conclusion, the results obtained in this study suggest that PPARγ plays an important role in the regulation of the vascular inflammatory response. The effects observed with the PPARγ activator pioglitazone in VSMC from SHR confirm that this receptor is a key in the reduction of ROS production induced by cytokines and in the expression of proinflammatory enzymes such as COX-2. As we have shown, the increase in RAS activation observed in SHR rats is involved in the reduction of PPARγ levels found in this strain. The lower expression levels of this nuclear receptor suppose a reduction in a protective endogenous mechanism against to the increase in the oxidative stress and the vascular inflammatory response induced by high levels of proinflammatory cytokines described in hypertension. In addition, the increase in COX-2 expression associated to the lower levels of PPARγ in SHR rats, showed in this study, could help to explain the functional and structural alterations described in the hypertensive pathology.

BIBLIOGRAFÍA

Abe M, Hasegawa K, Wada H, Morimoto T, Yanazume T, Kawamura T, Hirai M, Furukawa Y, Kita T. GATA-6 is involved in PPARgamma-mediated activation of differentiated phenotype in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(3):404-10.

Abe K, Nakashima H, Ishida M, Miho N, Sawano M, Soe NN, Kurabayashi M, Chayama K, Yoshizumi M, Ishida T. Angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves Gq/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. Hypertens Res 2008; 31(5):987-98.

Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. J Biol Chem 1999; 274(8):5038-46.

Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. J Hypertens 2005; 23(5):1025-36.

Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass CK, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. Mol Cell Biol 2002; 22(8):2607-19.

Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci. 2004;75(6):639-53.

Alexis JD, Wang N, Che W, Lerner-Marmarosh N, Sahni A, Korshunov VA, Zou Y, Ding B, Yan C, Berk BC, Abe J. Bcr kinase activation by angiotensin II inhibits peroxisome-proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity in vascular smooth muscle cells. Circ Res 2009; 104(1):69-78.

Alfranca A, Iñiguez MA, Fresno M, Redondo JM. Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res 2006; 70(3):446-56.

Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, Lobb RR, Sanz MJ. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. Blood 2004; 104(2):402-8.

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(4):767-77.

Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther 2007; 321(1):381-8.

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. Br J Pharmacol 2008a; 153(5):926-35.

Alvarez SE, Seguin LR, Villarreal RS, Nahmias C, Ciuffo GM. Involvement of c-Src tyrosine kinase in SHP-1 phosphatase activation by Ang II AT2 receptors in rat fetal tissues. J Cell Biochem 2008b; 105(3):703-11.

Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP. Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. Free Radic Biol Med 2006; 41(2):193-201.

Ameshima S, Golpon H, Cool CD, Chan D, Vandivier RW, Gardai SJ, Wick M, Nemenoff RA, Geraci MW, Voelkel NF. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. Circ Res 2003; 92(10):1162-9.

An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, Wang HD. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. Cardiovasc Res 2007; 75(4):702-9.

Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. Circulation 2005; 112(5):759-70.

Antus B, Exton MS, Rosivall L. Angiotensin II: a regulator of inflammation during renal disease? Int J Immunopathol Pharmacol 2001; 14(1):25-30.

Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(3):475-82.

Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kubota N, Saito T, Masuda Y, Kadowaki T, Komuro I. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. Circulation 2002; 105(10):1240-6.

Bachschmid M, Thurau S, Zou MH, Ullrich V. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation.FASEB J 2003; 17(8):914-6.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med 2001; 79(2-3):76-102.

Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. Am J Physiol 1995; 269(6 Pt 1):L829-36.

Barger PM, Brandt JM, Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha during cardiac hypertrophic growth. J Clin Invest 2000; 105(12):1723-30.

Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, Mangelsdorf DJ, Evans RM. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. Mol Endocrinol 2005; 19(10):2466-77.

Basuroy S, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H. Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF{alpha} in cerebral vascular endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol 2009 296(3):C422-32.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2007; 87(1):245-313.

Beltrán AE, Briones AM, García-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. J Hypertens 2009; 27(1):142-54.

Benkirane K, Amiri F, Diep QN, El Mabrouk M, Schiffrin EL. PPAR-gamma inhibits ANG II-induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006a; 290(1):H390-7.

Benkirane K, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates angiotensin II-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in blood vessels in vivo. Hypertension 2006b; 47(1):102-8.

Benson S, Wu J, Padmanabhan S, Kurtz TW, Pershadsingh HA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma expression in human vascular smooth muscle cells: inhibition of growth, migration, and c-fos expression by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma activator troglitazone. Am J Hypertens 2000; 13(1 Pt 1):74-82.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. Hypertension 2001a; 38(5):1107-11.

Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC. Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. Hypertension 2001b; 37(2 Part 2):781-6.

Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18(10):1655-61.

Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. Br J Pharmacol 2000; 129(5):823-34.

Bishop-Bailey D, Warner TD. PPARgamma ligands induce prostaglandin production in vascular smooth muscle cells: indomethacin acts as a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma antagonist. FASEB J 2003; 17(13):1925-7.

Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK.Synchronous activation of ERK 1/2, p38MAPK and PKB/Akt signaling by H2O2 in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. Int J Mol Med 2003; 11(2):229-34.

Blanco-Rivero J, Cachofeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salaices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. Hypertension 2005; 46(1):107-12.

Blanco-Rivero J, Márquez-Rodas I, Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, Ferrer M, Balfagón G. Long-term fenofibrate treatment impairs endothelium-dependent dilation to acetylcholine by altering the cyclooxygenase pathway. Cardiovasc Res 2007; 75(2):398-407.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 85(2-5):267-73.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology 1996; 137(1):354-66.

Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. J Biol Chem 1998; 273(37):23786-92.

Bolego C, Buccellati C, Radaelli T, Cetin I, Puglisi L, Folco G, Sala A. eNOS, COX-2, and prostacyclin production are impaired in endothelial cells from diabetics. Biochem Biophys Res Commun 2006; 339(1):188-90.

Bolten CW, Payne MA, McDonald WG, Blanner PM, Chott RC, Ghosh S, Arhancet GB, Staten NR, Gulve EA, Sullivan PM, Hromockyj AE, Colca JR. Thiazolidinediones inhibit the progression of established hypertension in the Dahl salt-sensitive rat. Diab Vasc Dis Res 2007; 4(2):117-23.

Boos CJ, Lip GY. Is hypertension an inflammatory process? Curr Pharm Des 2006; 12(13):1623-35.

Bouhlel MA, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Peroxisome proliferator-activated receptors: from active regulators of macrophage biology to pharmacological targets in the treatment of cardiovascular disease. J Intern Med 2008; 263(1):28-42.

Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries.Biochem Pharmacol 2000; 59(1):13-23.

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. Endocrinology 1996; 137(1):354-66.

Bren-Mattison Y, Meyer AM, Van Putten V, Li H, Kuhn K, Stearman R, Weiser-Evans M, Winn RA, Heasley LE, Nemenoff RA. 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 2008; 73(3):709-17.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagón G, Salaices M.Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. Br J Pharmacol 2000 Sep; 131(2):185-94.

Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Tovar S, Vila E, Salaices M Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolysaccharide effects on small mesenteric arteries. Life Sci 2002; 71(17):1997-2014.

Briones AM, Salaices M, Vila E. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1beta exposure in mesenteric resistance arteries. Mech Ageing Dev 2005; 126(6-7):710-21.

Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. J Vasc Res 2005; 42(5): 415-23.

Brown N, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1999; 85(6):524-33.

Bruemmer D, Yin F, Liu J, Berger JP, Kiyono T, Chen J, Fleck E, Van Herle AJ, Forman BM, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells. Mol Endocrinol 2003a; 17(6):1005-18.

Bruemmer D, Yin F, Liu J, Berger JP, Sakai T, Blaschke F, Fleck E, Van Herle AJ, Forman BM, Law RE. Regulation of the growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 (GADD45) by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells. Circ Res 2003b; 93(4):e38-47.

Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, Yang D, Chan TM, Nadler JL, Scott S, Rude RK, Hsueh WA. Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. J Clin Invest 1995; 96(1):354-60.

Cabré F. PPAR, Dianas versátiles para nuevas estrategias terapeúticas Actualidad en farmacología y terapéutica 2004: 2(4): 121-7.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. Clin Sci (Lond) 2006 110(2):243-53.

Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(1):52-7.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res 2005; 68(1):26-36.

Cao W, Cheng L, Behar J, Biancani P, Harnett KM. IL-1beta signaling in cat lower esophageal sphincter circular muscle.Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006; 291(4):G672-80.

Cao Z, Liu LZ, Dixon DA, Zheng JZ, Chandran B, Jiang BH. Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. Cell Signal 2007; 19(7):1542-53.

Castoldi G, Di Gioia CR, Pieruzzi F, D'Orlando C, Van De Greef WM, Busca G, Sperti G, Stella A. Angiotensin II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284(2):H635-43.

Cevik MO, Katsuyama M, Kanda S, Kaneko T, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Kakehi T, Cui W, Sasaki M, Yabe-Nishimura C. The AP-1 site is essential for the promoter activity of NOX1/NADPH oxidase, a vascular superoxide-producing enzyme: Possible involvement of the ERK1/2-JunB pathway. Biochem Biophys Res Commun 2008; 374(2):351-5.

Chakrabarti R, Vikramadithyan RK, Misra P, Hiriyan J, Raichur S, Damarla RK, Gershome C, Suresh J, Rajagopalan R. Ragaglitazar: a novel PPAR alpha PPAR gamma agonist with potent lipid-lowering and insulin-sensitizing efficacy in animal models. Br J Pharmacol 2003; 140(3):527-37.

Chan SH, Tai MH, Li CY, Chan JY. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. Free Radic Biol Med 2006; 40(11):2028-39.

Chandramohan G, Bai Y, Norris K, Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND. Effects of dietary salt on intrarenal angiotensin system, NAD(P)H oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 expressions and NF-kappaB activity in salt-sensitive and -resistant rat kidneys. Am J Nephrol 2008; 28(1):158-67.

Charette L, Misquitta C, Guay J, Reindeau D, Jones TR. Involvement of cyclooxygenase 2 (COX-2) in intrinsic tone of isolated guinea pig trachea. Can J Physiol Pharmacol 1995; 73(11):1561-7.

Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S, Gonzalez-Albert V, Jiménez J, Tormos MC, Espinosa O, Giner V, Iradi A, Saez G, Redon J. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. Am J Hypertens 2007; 20(1):62-9.

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. Mol Cell 2001; 7(1):161-71.

Chawla A, Lee CH, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, Han J, Kang H, Evans RM. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2003; 100(3):1268-73.

Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature 1995; 377(6548):454-7.

Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. Circ Res 1998; 83(9):952-9.

Chen J, Mehta JL. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291(4):H1738-45.

Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. J Clin Invest 1999; 103(7):953-61.

Cheng G, Lambeth JD. Alternative mRNA splice forms of NOXO1: differential tissue expression and regulation of Nox1 and Nox3. Gene 2005; 356:118-26.

Chiarelli F, Di Marzio D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. Vasc Health Risk Manag 2008; 4(2):297-304

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem 1998; 273(40):25573-80.

Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. Circulation 2000; 101(20):2411-7.

Chinetti-Gbaguidi G, Fruchart JC, Staels B. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. Curr Opin Pharmacol 2005; 5(2):177-83.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162(1):156-9.

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. Upregulation of vascular endothelial growth factor by H2O2 in rat heart endothelial cells. Free Radic Biol Med 1998; 25(8):891-7.

Chun KS, Surh YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. Biochem Pharmacol 2004; 68(6):1089-100.

Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS. 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 2000; 275(42):32681-7.

Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Zucchelli M, de Cesare D, Ucchino S, Spigonardo F, De Luca M, Muraro R, Bei R, Bucci M, Cuccurullo F, Mezzetti A. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E2-dependent matrix metalloproteinase activity. Circulation 2004; 109(12):1482-8.

Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. J Immunol 2000; 164(3):1364-71.

Cok SJ, Acton SJ, Sexton AE, Morrison AR. Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA. J Biol Chem 2004; 279(9):8196-205.

Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, Puri PL. 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 2003; 195(3):402-10.

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. 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 2003; 107(7):1017-23.

Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular biology of the isoprostanes. J Vasc Res 2001; 38(2):93-103.

Csonka C, Pataki T, Kovacs P, Müller SL, Schroeter ML, Tosaki A, Blasig IE. Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. Free Radic Biol Med 2000; 29(7):612-9.

Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, Kelly CJ. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. J Immunol 2002a; 168(6):2795-802.

Cunard R, DiCampli D, Archer DC, Stevenson JL, Ricote M, Glass CK, Kelly CJ. WY14643, a PPAR alpha ligand, has profound effects on immune responses in vivo. J Immunol 2002b; 169(12):6806-12.

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. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. Eur J Pharmacol 2004; 483(1):79-93.

DAIS study: Effect of fenofibrate on progression of coronary-artery disease in type 2 diabetes. the Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomised study. Lancet 2001; 357(9260):905-10.

Dammanahalli KJ, Sun Z. Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008; 35(1):2-6.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. Circ Res 2001; 89(8):650-60.

Dean JL, Brook M, Clark AR, Saklatvala J. p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. J Biol Chem 1999; 274(1):264-9.

De Ciuceis C, Amiri F, Iglarz M, Cohn JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Synergistic vascular protective effects of combined low doses of PPARalpha and PPARgamma activators in angiotensin II-induced hypertension in rats. Br J Pharmacol 2007; 151(1):45-53.

De Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. Hypertension 1995; 25(5):924-7.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T.International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.Pharmacol Rev 2000; 52(3):415-72. 7.

DeLano FA, Balete R, Schmid-Schönbein GW. Control of oxidative stress in microcirculation of spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288(2):H805-12.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. 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 1999a; 274(45):32048-54.

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. 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 1999b; 85(5):394-402.

Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. J Biol Chem 2000; 275(47):36703-7.

Deng P, Zhao SP, Dai HY, Guan XS, Huang HG. Atorvastatin reduces the expression of COX-2 mRNA in peripheral blood monocytes from patients with acute myocardial infarction and modulates the early inflammatory response. Clin Chem 2006; 52(2):300-3.

Deng WG, Montero AJ, Wu KK. Interferon-gamma suppresses cyclooxygenase-2 promoter activity by inhibiting C-Jun and C/EBPbeta binding. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27(8):1752-9.

De Oliveira-Marques V, Cyrne L, Marinho HS, Antunes F.A. Quantitative study of NF-kappaB activation by H2O2: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. J Immunol 2007; 178(6):3893-902.

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. 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 2001; 193(7):827-38.

De Stefano D, Maiuri MC, Simeon V, Grassia G, Soscia A, Cinelli MP, Carnuccio R. Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. Eur J Pharmacol 2007; 566(1-3):192-9.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev 1999; 20(5):649-88.

Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. Nature 1996; 384(6604):39-43.

Diep QN, Schiffrin EL. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2001; 38(2):249-54.

Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Circulation 2002a; 105(19):2296-302.

Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. Hypertension 2002b; 40(6):866-71.

Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL. PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. J Mol Cell Cardiol 2004a; 36(2):295-304.

Diep QN, Amiri F, Benkirane K, Paradis P, Schiffrin EL. Long-term effects of the PPAR gamma activator pioglitazone on cardiac inflammation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Can J Physiol Pharmacol 2004b; 82(11):976-85.

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(9):1340-51.

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griendling KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. Circulation 2005; 112(17):2668-76.

Di Mari JF, Saada JI, Mifflin RC, Valentich JD, Powell DW.HETEs enhance IL-1-mediated COX-2 expression via augmentation of message stability in human colonic myofibroblasts. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 293(4):G719-28.

Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, Bacanamwo M, Chen YE, Schneider MD, Mangelsdorf DJ, Evans RM, Yang Q. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. Cardiovasc Res 2007; 76(2):269-79.

Doller A, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. Mol Biol Cell 2007; 18(6):2137-48.

Doller A, Akool el-S, Huwiler A, Müller R, Radeke HH, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. Mol Cell Biol 2008; 28(8):2608-25.

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. 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 2005; 366(9493):1279-89.

Dorrance AM. Interleukin 1-beta (IL-1beta) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats. Vascul Pharmacol 2007; 47(2-3):160-5.

DREAM (Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators, Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N, Hanefeld M, Hoogwerf B, Laakso M, Mohan V, Shaw J, Zinman B, Holman RR. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. Lancet 2006; 368(9541):1096-105.

Duque J, Díaz-Muñoz MD, Fresno M, Iñiguez MA. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in colon carcinoma cells. Cell Signal 2006; 18(8):1262-9.

El-Haroun H, Bradbury D, Clayton A, Knox AJ. 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 2004; 94(3):353-61.

El Midaoui A, Wu L, Wang R, de Champlain J. Modulation of cardiac and aortic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression by oxidative stress in chronically glucose-fed rats. Am J Hypertens 2006; 19(4):407-12.

Erbe DV, Gartrell K, Zhang YL, Suri V, Kirincich SJ, Will S, Perreault M, Wang S, Tobin JF. Molecular activation of PPARgamma by angiotensin II type 1-receptor antagonists. Vascul Pharmacol 2006; 45(3):154-62.

Erdmann E, Dormandy JA, Charbonnel B, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM. The effect of pioglitazone on recurrent myocardial infarction in 2,445 patients with type 2 diabetes and previous myocardial infarction: results from the PROactive (PROactive 05) Study. J Am Coll Cardiol 2007; 49(17):1772-80.

Faaveuw C, Fougeray S, Angeli V, Fontaine J, Chinetti G, Gosset P, Delerive P, Maliszewski C, Capron M, Staels B, Moser M, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. FEBS Lett 2000; 486(3):261-6.

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. FEBS Lett 1998; 438(1-2):55-60.

Faraci FM, Didion SP.Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24(8): 1367-73.

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(4):1669-75.

Fiévet C, Fruchart JC, Staels B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Curr Opin Pharmacol 2006; 6(6):606-14.

Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. Cell 1995; 83(5):803-12.

Freeman EJ, Ruehr ML, Dorman RV. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1998; 274(1 Pt 1):C282-8.

Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Ehrengruber MU, Chen YE. Early growth response factor-1 is a critical transcriptional mediator of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 1 gene expression in human aortic smooth muscle cells. J Biol Chem 2002; 277(30): 26808-14.

Fu M, Zhu X, Wang Q, Zhang J, Song Q, Zheng H, Ogawa W, Du J, Chen YE. Platelet-derived growth factor promotes the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. Circ Res 2001; 89(11):1058-64.

Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Zhao L, Ahmad M, Ehrengruber MU, Chen YE. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. Biochem J 2003; 370(Pt 3):1019-25.

Fujii T, Onohara N, Maruyama Y, Tanabe S, Kobayashi H, Fukutomi M, Nagamatsu Y, Nishihara N, Inoue R, Sumimoto H, Shibasaki F, Nagao T, Nishida M, Kurose H. alpha12/13-mediated production of reactive oxygen species is critical for angiotensin receptor-induced NFAT activation in cardiac fibroblasts. J Biol Chem 2005; 280(24):23041-7.

Fukuda N. Molecular mechanisms of the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells in hypertension. J Atheroscler Thromb 1997; 4(2):65-72.

Gao YJ, Lee RM. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. Gao YJ, Lee RM. Br J Pharmacol 2005; 146(8):1061-8.

García-Bueno B, Madrigal JL, Pérez-Nievas BG, Leza JC. Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation after stress in rats. Endocrinology 2008; 149(4):1969-78.

García-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M**,** Rodriguez-Martinez MA. 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 2000; 293(1):75-81.

García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, Salaices M. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased TXA2, Ca2+ and $O2^{-}$ levels. J Pharmacol Exp Ther 2009; 328(1):19-27.

Gavazzi G, Banfi B, Deffert C, Fiette L, Schappi M, Herrmann F, Krause KH. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. FEBS Lett 2006; 580(2):497-504.

Gbaguidi FG, Chinetti G, Milosavljevic D, Teissier E, Chapman J, Olivecrona G, Fruchart JC, Griglio S, Fruchart-Najib J, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. FEBS Lett 2002; 512(1-3):85-90.

Gelman L, Zhou G, Fajas L, Raspé E, Fruchart JC, Auwerx J. p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. J Biol Chem 1999; 274(12):7681-8.

Gervois P, Chopin-Delannoy S, Fadel A, Dubois G, Kosykh V, Fruchart JC, Najïb J, Laudet V, Staels B. Fibrates increase human REV-ERBalpha expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. Mol Endocrinol 1999; 13(3):400-9.

Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, Kosykh V, Fruchart JC, Kooistra T, Staels B. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. J Biol Chem 2001; 276(36):33471-7.

Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Drug insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007; 3(2):145-56.

Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. Circ Res 2003; 92(5):518-24.

Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. J Clin Invest 2000; 106(4):453-8.

Girnun GD, Domann FE, Moore SA, Robbins ME. Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. Mol Endocrinol 2002; 16(12):2793-801.

Goetze S, Xi XP, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. FEBS Lett 1999; 452(3):277-82.

Goetze S, Eilers F, Bungenstock A, Kintscher U, Stawowy P, Blaschke F, Graf K, Law RE, Fleck E, Gräfe M. PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. Biochem Biophys Res Commun 2002; 293(5):1431-7.

Goya K, Sumitani S, Xu X, Kitamura T, Yamamoto H, Kurebayashi S, Saito H, Kouhara H, Kasayama S, Kawase I. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24(4):658-63.

Graham TL, Mookherjee C, Suckling KE, Palmer CN, Patel L. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR (-/-) mice. Atherosclerosis 2005; 181(1):29-37.

Grau R, Iñiguez MA, Fresno M. Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. Cancer Res 2004; 64(15):5162-71.

Grau R, Punzón C, Fresno M, Iñiguez MA. Peroxisome-proliferator-activated receptor alpha agonists inhibit cyclo-oxygenase 2 and vascular endothelial growth factor transcriptional activation in human colorectal carcinoma cells via inhibition of activator protein-1. Biochem J 2006; 395(1):81-8.

Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(10):2175-83.

Griendling KK. NADPH oxidases: new regulators of old functions. Antioxid Redox Signal. 2006; 8(9-10):1443-5.

Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH2-terminal kinase and p38 MAPK signal pathways in rat renal mesangial cells. J Biol Chem 1998; 273(44):28670-6.

Guo RW, Yang LX, Wang H, Liu B, Wang L. Angiotensin II induces matrix metalloproteinase-9 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. Regul Pept 2008; 147(1-3):37-44.

Gurnell M, Wentworth JM, Agostini M, Adams M, Collingwood TN, Provenzano C, Browne PO, Rajanayagam O, Burris TP, Schwabe JW, Lazar MA, Chatterjee VK. A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis. J Biol Chem 2000; 275(8):5754-9.

Gurnell M, Savage DB, Chatterjee VK, O'Rahilly S. The metabolic syndrome: peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(6):2412-21.

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H2O2. Role in cell survival following oxidant injury. J Biol Chem 1996; 271(8):4138-42.

Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. Circulation 2002; 106(6):679-84.

Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, Smith U. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2005a; 73(1):65-75.

Hammarstedt A, Sopasakis VR, Gogg S, Jansson PA, Smith U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. Diabetologia 2005b; 48(1):96-104.

Hammoud RA, Vaccari CS, Nagamia SH, Khan BV. Regulation of the renin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: a review of the literature. Vasc Health Risk Manag 2007; 3(6):937-45.

Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. Circ Res 1999; 84(6):695-703.

Han D, Canali R, Garcia J, Aguilera R, Gallaher TK, Cadenas E.Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. Biochemistry 2005a; 44(36):11986-96.

Han KH, Ryu J, Hong KH, Ko J, Pak YK, Kim JB, Park SW, Kim JJ. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitricotement in vivo. Circulation 2005b; 111(11):1439-47.

Hansen MK, Connolly TM. Nuclear receptors as drug targets in obesity, dyslipidemia and atherosclerosis. Curr Opin Investig Drugs 2008; 9(3):247-55.

Haraguchi G, Kobayashi Y, Brown ML, Tanaka A, Isobe M, Gianturco SH, Bradley WA. PPAR (alpha) and PPAR(gamma) activators suppress the monocyte-macrophage apoB-48 receptor. J Lipid Res 2003; 44(6):1224-31.

He G, Sung YM, Fischer SM. Troglitazone induction of COX-2 expression is dependent on ERK activation in keratinocytes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2006; 74(3):193-7.

Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, Maclour J, Samuel JL, Lévy BI, Michel JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. Br J Pharmacol 1997; 121(1):83-90.

Hernández J, Astudillo H, Escalante B. Angiotensin II stimulates cyclooxygenase-2 mRNA expression in renal tissue from rats with kidney failure. Am J Physiol Renal Physiol 2002; 282(4):F592-8.

Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. Circulation 1997; 95(6):1532-41.

Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M. Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. Br J Pharmacol 2003; 140(4):671-80.

Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salaices 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(1):H225-34.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. N Engl J Med 2002; 346(25):1954-62.

Hinshaw DB, Sklar LA, Bohl B, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, Spragg RG, Cochrane CG. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. Am J Pathol 1986; 123(3):454-64.

Höcherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A. Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. Pflugers Arch 2001; 442(6):821-7.

Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. Cardiovasc Res 2004; 61(1):159-68.

Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, Rosenfeld MG. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 1995; 377(6548):397-404.

Hsueh WA, Bruemmer D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. Hypertension 2004; 43(2): 297-305.

Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. J Pharmacol Exp Ther 2002; 303(2):563-73.

Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. Nature 1999; 400(6742):378-82.

Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. Am J Physiol Cell Physiol 2005; 288(4):C899-905.

Hwang J, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Campbell AG, Thulé PM, Sutliff RL, Hart CM. The PPARgamma ligand, rosiglitazone, reduces vascular oxidative stress and NADPH oxidase expression in diabetic mice. Vascul Pharmacol 2007; 46(6):456-62.

Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(1):45-51.

Ikeda U, Shimpo M, Murakami Y, Shimada K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. Hypertension 2000; 35(6):1232-6.

Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 246(2):370-4.

Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. J Biol Chem 2000; 275(36):28028-32.

Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. Hypertension 2001; 38 (3 Pt 2): 581-7.

Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Kasuya Y, Sakai S, Goto K, Yamaguchi I. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha decreases endothelin-1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation in cardiomyocytes. J Cardiovasc Pharmacol 2004; 44 Suppl 1:S358-61

Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 1990; 347(6294):645-50.

Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ, Best CF, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin II receptor gene. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995; 92(8):3521-5.

Izumi Y, Kim S, Zhan Y, Namba M, Yasumoto H, Iwao H. Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. Hypertension 2000; 36(4):511-6.

Jaimes EA, Tian RX, Pearse D, Raij L. Up-regulation of glomerular COX-2 by angiotensin II: role of reactive oxygen species. Kidney Int 2005; 68(5):2143-53.

Jaimes EA, Zhou MS, Pearse DD, Puzis L, Raij L. Upregulation of cortical COX-2 in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II and reactive oxygen species. Am J Physiol Renal Physiol 2008; 294(2):F385-92.

Jarrar MH, Baranova A. PPARgamma activation by thiazolidinediones (TZDs) may modulate breast carcinoma outcome: the importance of interplay with TGFbeta signalling. J Cell Mol Med 2007; 11(1):71-87.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 1998; 391(6662):82-6.

Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J, Moller DE, Zhang BB. Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists. Diabetes 2002; 51(8):2412-9.

Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Cohen RA. 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 2004a; 279(19):20363-8.

Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA. Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. J Biol Chem 2004b; 279(2):1323-9.

Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. Mol Aspects Med 2005; 26(4-5):340-52.

Jones PL, Ping D, Boss JM. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. Mol Cell Biol 1997; 17(12):6970-81.

Jones DC, Ding X, Zhang TY, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates T-bet transcription through suppression of p38 mitogen-activated protein kinase activation. J Immunol 2003; 171(1):196-203.

Jonkers IJ, Mohrschladt MF, Westendorp RG, van der Laarse A, Smelt AH. Severe hypertriglyceridemia with insulin resistance is associated with systemic inflammation: reversal with bezafibrate therapy in a randomized controlled trial. Am J Med 2002; 112(4):275-80.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. J Clin Invest 1994; 93(6):2431-7.

Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1996; 93(12): 5793-6.

Kamata H, Manabe T, Oka S, Kamata K, Hirata H. Hydrogen peroxide activates IkappaB kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. FEBS Lett 2002; 519(1-3):231-7.

Kang YJ, Kim HS, Choi HC. Troglitazone increases IL-1beta induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression via enhanced phosphorylation of IkappaBalpha in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. Biol Pharm Bull 2008; 31(10):1955-8.

Kapoor M, Kojima F, Qian M, Yang L, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deficiency is associated with elevated peroxisome proliferator-activated receptor gamma: regulation by prostaglandin E2 via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway.J Biol Chem 2007; 282(8):5356-66.

Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A. 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 2002; 51(5):1507-14.

Kim S, Iwao H. Stress and vascular responses: mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 as promising therapeutic targets of vascular remodeling. J Pharmacol Sci 2003; 91(3):177-81.

Kim MS, Sweeney TR, Shigenaga JK, Chui LG, Moser A, Grunfeld C, Feingold KR. Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXRalpha, PPARalpha, PPARgamma, LXRalpha, and the coactivators SRC-1, PGC-1alpha, and PGC-1beta in liver cells. Metabolism 2007; 56(2):267-79.

Kim HY, Kang YJ, Song IH, Choi HC, Kim HS.Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. Hypertens Res 2008; 31(3):515-23.

Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. Diabetes 2003; 52(10):2570-7.

Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HM, Kooistra T. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. Blood 2003; 101(2):545-51.

Klein T, Shephard P, Kleinert H, Kömhoff M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by cyclic AMP. Biochim Biophys Acta 2007; 1773(11):1605-18.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1994; 91(15):7355-9.

Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J_2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. Cell 1995; 83(5):813-9.

Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1997; 94(9):4318-23.

Klotz L, Diehl L, Dani I, Neumann H, von Oppen N, Dolf A, Endl E, Klockgether T, Engelhardt B, Knolle P. Brain endothelial PPARgamma controls inflammation-induced CD4+ T cell adhesion and transmigration in vitro. J Neuroimmunol 2007; 190(1-2):34-43.

Knowles RG, Salter M, Brooks SL, Moncada S. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung, liver and aorta of the rat. Biochem Biophys Res Commun 1990; 172(3):1042-8.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. Pharmacol Rev 2007; 59(3):251-87.

Koh KK, Quon MJ, Han SH, Chung WJ, Lee Y, Shin EK. Anti-inflammatory and metabolic effects of candesartan in hypertensive patients. Int J Cardiol 2006; 108(1):96-100.

Konturek PC, Brzozowski T, Kania J, Kukharsky V, Bazela K, Kwiecien S, Harsch I, Konturek SJ, Hahn EG. Pioglitazone, a specific ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma reduces gastric mucosal injury induced by ischaemia/ reperfusion in rat. Scand J Gastroenterol 2003; 38(5):468-76.

Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. Metabolism 2001; 50(11):1294-300.

Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczko W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production.J Physiol Pharmacol 2006; 57(4):529-39.

Krattinger N, Alonso F, Capponi A, Mazzolai L, Nicod P, Meda P, Haefliger JA. Increased expression of renal Cyclooxygenase-2 and neuronal nitric oxide synthase in hypertensive Cx40-deficient Mice. J. Vasc Res 2008; 46(3):188-198.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell 1999; 4(4):597-609.

Kumar U, Chen J, Sapoznikhov V, Canteros G, White BH, Sidhu A. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. Clin Exp Hypertens 2005; 27(1):17-31.

Kwon S, Fang LH, Kim B, Ha TS, Lee SJ, Ahn HY. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. J Pharmacol Sci 2004; 95(2):267-72.

Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Suzaki Y, Abe S, Hasegawa T, Tamaki T.Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogen-activated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). Biochem Pharmacol 2002; 64(10):1521-31.

Lacroix S, Rivest S. 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 1998; 70(2):452-66

Lagathu C, Bastard JP, Auclair M, Maachi M, Capeau J, Caron M. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. Biochem Biophys Res Commun 2003; 311(2):372-9.

Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. Free Radic Biol Med 2007; 43(3):319-31.

LaPointe MC, Isenović E. Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. Hypertension 1999; 33(1 Pt 2):276-82.

Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. Circ Res 2001; 88(9):888-94.

Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 285(2):R277-97.

Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. Circulation 2000; 101(11):1311-8.

Lee K, Esselman WJ. Inhibition of PTPs by H(2)O(2) regulates the activation of distinct MAPK pathways. Free Radic Biol Med 2002; 33(8):1121-32.

Lee HK, Jeong S. Beta-Catenin stabilizes cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3'-UTR. Nucleic Acids Res 2006; 34(19):5705-14.

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. Hydrogen peroxide-induced VCAM-1 expression in pancreatic islets and beta-cells through extracellular Ca2+ influx. Transplantation 2008; 86(9):1257-66.

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem 1995; 270(22):12953-6.

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. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. FEBS Lett 2000; 473(3):333-6.

Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. FEBS Lett 1997; 404(2-3):249-52.

Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. J Clin Invest 2000a; 106(4):523-31.

Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. J Biol Chem 2002; 277(22):19952-60.

Li J, Wang J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, Wong J. Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. EMBO J 2000b; 19(16):4342-50.

Li J, Chen YJ, Quilley J. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. J Pharmacol Exp Ther 2005; 314(2):818-24.

Li Q, Engelhardt JF. Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase. J Biol Chem 2006a; 281(3):1495-505.

Li S, Wang X, Qiu J, Si Q, Wang H, Guo H, Sun R, Wu Q. Angiotensin II stimulates endothelial integrin beta3 expression via nuclear factor-kappaB activation. Exp Aging Res 2006b; 32(1):47-60.

Liang P, Jiang B, Yang X, Xiao X, Huang X, Long J, Zhang P, Zhang M, Xiao M, Xie T, Huang X. The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epidermal growth factor-induced HaCaT cell proliferation. Exp Cell Res 2008; 314(17):3142-51.

Lin Y, Zhu X, McLntee FL, Xiao H, Zhang J, Fu M, Chen YE. Interferon regulatory factor-1 mediates PPARgamma-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24(2):257-63.

Lin SJ, Shyue SK, Hung YY, Chen YH, Ku HH, Chen JW, Tam KB, Chen YL. Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25(2):334-40.

Lin SJ, Shyue SK, Shih MC, Chu TH, Chen YH, Ku HH, Chen JW, Tam KB, Chen YL. Superoxide dismutase and catalase inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced human aortic smooth muscle cell proliferation: role of cell-cycle regulation, mitogen-activated protein kinases, and transcription factors. Atherosclerosis 2007; 190(1):124-34.

Liu D, Zeng BX, Zhang SH, Yao SL. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. Inflamm Res 2005; 54(11):464-70.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods 2001; 25(4):402-8.

Llopis J, Westin S, Ricote M, Wang Z, Cho CY, Kurokawa R, Mullen TM, Rose DW, Rosenfeld MG, Tsien RY, Glass CK. Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2000; 97(8):4363-8.

Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. Am J Physiol 1993: L406-12.

Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. J Biol Chem 1996; 271(26):15703-7.

Lu Y, Wahl LM. Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. J Immunol 2005; 175(8):5423-9.

Lumbers ER. Angiotensin and aldosterone. Regul Pept 1999; 80(3):91-100.

Lüpertz R, Chovolou Y, Kampkötter A, Wätjen W, Kahl R. Catalase overexpression impairs TNF-alpha induced NF-kappaB activation and sensitizes MCF-7 cells against TNF-alpha. J Cell Biochem 2008; 103(5):1497-511.

Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. Physiology (Bethesda) 2006; 21:269-80.

Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M, Wysocki J, Szygula B, Kalina Z, Herman ZS. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. Int J Clin Pharmacol Ther 1998; 36(6):345-9.

Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of renin- angiotensina system in vascular inflammation. Trends Pharmacol Sci 2008; 29(7): 367-74.

Marikovsky M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn superoxide dismutase plays important role in immune response. J Immunol 2003; 170(6):2993-3001.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. J Auton Pharmacol 1995; 15(4):279-307.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. Pharmacol Ther 1997; 75(2):111-34.

Martin G, Dol F, Marés AM, Berezowski V, Staels B, Hum DW, Schaeffer P, Herbert JM. Lesion progression in apoE-deficient mice: implication of chemokines and effect of the AT1 angiotensin II receptor antagonist irbesartan. J Cardiovasc Pharmacol 2004; 43(2):191-9.

Martin-Nizard F, Furman C, Delerive P, Kandoussi A, Fruchart JC, Staels B, Duriez P. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol 2002; 40(6):822-31.

Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM.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 1993; 92(4):1866-74.

Maruyama S, Kato K, Kodama M, Hirono S, Fuse K, Nakagawa O, Nakazawa M, Miida T, Yamamoto T, Watanabe K, Aizawa Y. Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha activator, suppresses experimental autoimmune myocarditis by stimulating the interleukin-10 pathway in rats. J Atheroscler Thromb; 9(2):87-92.

Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. Circ Res 1998; 83(11):1097-103.

Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. Circulation 1999; 99(24):3125-31.

Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. J Immunol 2000; 164(12):6503-8.

Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. Circ Res 2002; 90(6):703-10.

Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. Circ Res 2004; 94(9):1168-78.

Mateo T, Abu Nabah YN, Abu Taha M, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Proudfoot AE, Stahl RA, Issekutz AC, Cortijo J, Morcillo EJ, Jose PJ, Sanz MJ. Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. J Immunol 2006; 176(9):5577-86.

Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, Deby-Dupont G, Crielaard JM, Henrotin Y. Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. Osteoarthritis Cartilage 2008; 16(7):756-63.

Matsumoto T, Noguchi E, Kobayashi T, Kamata K. Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. Free Radic Biol Med 2007; 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. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. Circulation 2005; 112(17):2677-85.

McGuire DK, Winterfield JR, Rytlewski JA, Ferrannini E. Blocking the renin-angiotensin-aldosterone system to prevent diabetes mellitus. Diab Vasc Dis Res 2008; 5(1):59-66.

Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. J Biol Chem 1999; 274(12):8328-34.

Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D. Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(12):2203-8.

Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG. Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. Biochem J 1989; 263(2):539-45.

Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279(2):H741-51.

Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. Cell Biol Toxicol 2003; 19(4):203-14.

Mendez M, LaPointe MC. PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes. Hypertension 2003; 42(4):844-50.

Mendez M, LaPointe MC. PGE2-induced hypertrophy of cardiac myocytes involves EP4 receptor-dependent activation of p42/44 MAPK and EGFR transactivation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288(5):H2111-7.

Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. JHypertens 2001; 38(3 Pt 2):635-8.

Miller FJ Jr, Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and ClC-3. Circ Res 2007; 101(7):663-71.

Mistry M, Nasjletti A. Contrasting effect of thromboxane synthase inhibitors and a thromboxane receptor antagonist on the development of angiotensin II-salt-induced hypertension in rats. J Pharmacol Exp Ther 1990; 253(1):90-4.

Mitchell JA, Larkin S, Williams TJ. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. Biochem Pharmacol 1995; 50(10):1535-42.

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. Br J Pharmacol 1999; 128(6):1121-32.

Miyazaki Y, Cersosimo E, Triplitt C, DeFronzo RA.. Rosiglitazone decreases albuminuria in type 2 diabetic patients. Kidney Int 2007; 72(11):1367-73.

Momoi A, Murao K, Imachi H, Ishida T, Cao WM, Sato M, Takahara J. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 expression in cytokine-treated human lung epithelial cells by thiazolidinedione. Chest 2001; 120(4):1293-300.

Moon TC, Befus AD. Exogenous nitric oxide regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin D(2) generation through p38 MAPK in mouse bone marrow-derived mast cells. Free Radic Biol Med 2008; 45(6):780-8.

Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MA, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S, Takeshita A. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. J Clin Invest 2003; 112(12):1871-9.

Morinelli TA, Walker LP, Ullian ME. COX-2 expression stimulated by Angiotensin II depends upon AT1 receptor internalization in vascular smooth muscle cells. Biochim Biophys Acta 2008; 1783(6):1048-54.

Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. Hypertension 2000; 35(1 Pt 2):193-201.

Mulvany MJ. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. J Vasc Res 2003; 40(6):558-60.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. Nature 1991; 351(6323):233-6.

Muthalif MM, Karzoun NA, Benter IF, Gaber L, Ljuca F, Uddin MR, Khandekar Z, Estes A, Malik KU. Functional significance of activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in angiotensin II induced vascular hyperplasia and hypertension. Hypertension 2002; 39(2 Pt 2):704-9.

Muzykantov VR. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. J Control Release 2001; 71(1):1-21.

Nabha L, Garbern JC, Buller CL, Charpie JR. Vascular oxidative stress precedes high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens 2005; 27(1):71-82.

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. Cell 1998; 93(2):229-40.

Nakao S, Ogata Y, Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H. Activation of NFkappaB is necessary for IL-1beta-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human gingival fibroblasts. Mol Cell Biochem 2000; 209(1-2):113-8.

Nakao N, Kurokawa T, Nonami T, Tumurkhuu G, Koide N, Yokochi T. Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor-alpha in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. Innate Immun 2008; 14(3):190-6.

Nakamura Y, Ohya Y, Onaka U, Fujii K, Abe I, Fujishima M. Inhibitory action of insulin-sensitizing agents on calcium channels in smooth muscle cells from resistance arteries of guinea-pig. Br J Pharmacol 1998; 123(4):675-82.

Nakamura T, Sakamoto K. Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 284(1):203-10.

Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. Stroke 2007; 38(11):3016-22.

Nesto RW, Bell D, Bonow RO, Fonseca V, Grundy SM, Horton ES, Le Winter M, Porte D, Semenkovich CF, Smith S, Young LH, Kahn R. Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. Diabetes Care 2004; 27(1):256-63.

Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, Staels B, Jude B. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. Circulation 2001; 103(2):207-12.

Nieminen R, Leinonen S, Lahti A, Vuolteenaho K, Jalonen U, Kankaanranta H, Goldring MB, Moilanen E. Inhibitors of mitogen-activated protein kinases downregulate COX-2 expression in human chondrocytes. Mediators Inflamm 2005; 2005(5):249-55.

Nishio E, Watanabe Y. Transforming growth factor beta is a modulator of platelet-derived growth factor action in vascular smooth muscle cells: a possible role for catalase activity and glutathione peroxidase activity. Biochem Biophys Res Commun 1997; 232(1):1-4.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Nature 1998; 395(6698):137-43.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med 2001; 31(11):1287-312.

Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. ScientificWorld Journal 2007; 7:1359-74.

Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, Kahn CR. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. J Clin Invest 2003; 112(4):608-18.

Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Engelhardt JF, Sunagawa K. Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2007; 50(1):62-8.

Ogawa D, Nomiyama T, Nakamachi T, Heywood EB, Stone JF, Berger JP, Law RE, Bruemmer D. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells. Circ Res 2006; 98(7):e50-9.

Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Hypertension 2000; 35(1 Pt 1):68-75.

Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001; 98(9):5306-11.

Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikeda N, Miyake T, Matsuzaki M. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca^{2+}-independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. FEBS Lett 2001; 487(3):361-6.

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. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines. J Gastroenterol 2008; 43(7):538-49.

Oyama Y, Akuzawa N, Nagai R, Kurabayashi M. PPARgamma ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. Circ Res 2002; 90(3):348-55.

Panigrahy D, Huang S, Kieran MW, Kaipainen A. PPARgamma as a therapeutic target for tumor angiogenesis and metastasis. Cancer Biol Ther 2005; 4(7):687-93.

Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertensión. Cardiovasc Res 2006; 71 (2): 247-58.

Paravicini TM, Touyz RM. NAD(P)H oxidases, reactive oxygen species, and hipertensión: clinical implications and therapeutic posibilities. Diabetes Care 2008; 31 Suppl 2: S170-80.

Parkington HC, Coleman HA, Tare M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. Pharmacol Res. 2004; 49(6):509-14.

Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. Circulation 2000; 101(3):235-8.

Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. Nature 2005; 437(7059):759-63.

Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A. Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. Circulation 1999; 100 (15):1646-52.

Patel KM, Wright KL, Whittaker P, Chakravarty P, Watson ML, Ward SG. Differential modulation of COX-2 expression in A549 airway epithelial cells by structurally distinct PPAR(gamma) agonists: evidence for disparate functional effects which are independent of NF-(kappa)B and PPAR(gamma). Cell Signal 2005; 17(9):1098-110.

Paukkeri EL, Leppänen T, Sareila O, Vuolteenaho K, Kankaanranta H, Moilanen E. PPARalpha agonists inhibit nitric oxide production by enhancing iNOS degradation in LPS-treated macrophages. Br J Pharmacol 2007; 152(7):1081-91.

Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. Nephrol Dial Transplant 2006; 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. Acute antiinflammatory properties of statins involve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha via inhibition of the protein kinase C signaling pathway. Circ Res 2006; 98(3):361-9.

Pelton P. GW-501516 GlaxoSmithKline/Ligand. Curr Opin Investig Drugs 2006; 7(4):360-70.

Peng T, Lu X, Feng Q. NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. FASEB J 2005; 19(2):293-5.

Peng H, Chen P, Cai Y, Chen Y, Wu QH, Li Y, Zhou R, Fang X. Endothelin-1 increases expression of cyclooxygenase-2 and production of interlukin-8 in hunan pulmonary epithelial cells. Peptides 2008; 29(3):419-24.

Pham H, Chong B, Vincenti R, Slice LW.Ang II and EGF synergistically induce COX-2 expression via CREB in intestinal epithelial cells. J Cell Physiol 2008; 214(1):96-109.

Picot D, Loll PJ, Garavito RM. X-ray crystallographic study of the structure of prostaglandin H synthase. Adv Exp Med Biol 1997; 400A:107-11.

Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. Circulation 2000; 102(17):2118-23.

Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25(9):1810-6.

Pontsler AV, St Hilaire A, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. J Biol Chem 2002; 277(15):13029-36.

Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(3):645-51.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. 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 1996; 97(8):1916-23.

Ravaux L, Denoyelle C, Monne C, Limon I, Raymondjean M, El Hadri K. Inhibition of interleukin-1beta-induced group IIA secretory phospholipase A2 expression by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in rat vascular smooth muscle cells: cooperation between PPARbeta and the proto-oncogene BCL-6. Mol Cell Biol 2007; 27(23):8374-87.

Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. Hypertension 2003; 41(5):1096-101.

Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, Padilla E, Tejerina T. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism. Diabetes 2005; 54(3):811-7.

Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O_2^- and systolic blood pressure in mice. Circ Res 2001; 89(5):408-14.

Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. 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 U.S.A. 1998; 95(13):7614-9.

Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. J Leukoc Biol 1999; 66(5):733-9.

Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. Biochim Biophys Acta 2007; 1771(8):926-35.

Rival Y, Benéteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Junquero D, Colpaert FC, Delhon A. PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. Eur J Pharmacol 2002; 435(2-3):143-51.

Robinson KA, Stewart CA, Pye QN, Nguyen X, Kenney L, Salzman S, Floyd RA, Hensley K. Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. J Neurosci Res 1999; 55(6):724-32.

Rodríguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, Palomer X, Laguna JC, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. 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 2008; 57(8):2149-57.

Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. Circulation 2005; 111(19):2509-17.

Rogers RJ, Monnier JM, Nick HS. Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. J Biol Chem 2001; 276(23):20419-27.

Roshak AK, Jackson JR, McGough K, Chabot-Fletcher M, Mochan E, Marshall LA. Manipulation of distinct NFkappaB proteins alters interleukin-1beta-induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation. J Biol Chem 1996; 271(49):31496-501.

Rosón MI, Cao G, Della Penna S, Gorzalczany S, Pandolfo M, Toblli JE, Fernández BE. Angiotensin II increases intrarenal transforming growth factor-beta1 in rats submitted to sodium overload independently of blood pressure. Hypertens Res 2008; 31(4):707-15.

Rudic RD, Brinster D, Cheng Y, Fries S, Song WL, Austin S, Coffman TM, FitzGerald GA. COX-2-derived prostacyclin modulates vascular remodeling. Circ Res 2005; 96(12):1240-7.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. Circ Res 2000; 86(12):1266-72.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Egido J.Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. Nephrol Dial Transplant 2001; 16 Suppl 1:27-33.

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. Curr Hypertens Rep 2003; 5(1):73-9.

Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. Curr Opin Nephrol Hypertens 2006; 15(2):159-66.

Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD. PPAR(gamma) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. Hypertension 2004; 43(3):661-6.

Sakai T, Kambe F, Mitsuyama H, Ishiguro N, Kurokouchi K, Takigawa M, Iwata H, Seo H. Tumor necrosis factor alpha induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like HCS-2/8 cells through activation of NF-kappaB: abrogation of the tumor necrosis factor alpha effect by proteasome inhibitors.J Bone Miner Res 2001; 16(7):1272-80.

Samaha FF, Szapary PO, Iqbal N, Williams MM, Bloedon LT, Kochar A, Wolfe ML, Rader DJ. Effects of rosiglitazone on lipids, adipokines, and inflammatory markers in nondiabetic patients with low high-density lipoprotein cholesterol and metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26(3):624-30.

Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. Pharmacol Rev 2007; 59(3):207-24.

Sánchez-Hidalgo M, Martín AR, Villegas I, de la Lastra CA. Rosiglitazone, a PPARgamma ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats. Eur J Pharmacol 2007; 562(3):247-58.

Sánchez-López E, López AF, Esteban V, Yagüe S, Egido J, Ruiz-Ortega M, Alvarez-Arroyo MV. Angiotensin II regulates vascular endothelial growth factor via hypoxia-inducible factor-1alpha induction and redox mechanisms in the kidney. Antioxid Redox Signal 2005; 7(9-10):1275-84.

Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, Lahera V, Cachofeiro V. 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 2005a; 288(1):H111-5.

Sanz-Rosa D, Cediel E, de las Heras N, Miana M, Balfagón G, Lahera V, Cachofeiro V. Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NFkappaB/IkappaB system. J Hypertens 2005b; 23(6):1167-72.

Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ. Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. Biochem Biophys Res Commun 1992; 185(1):253-9.

Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T. Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. Biochem Biophys Res Commun 1999; 254(3):757-63.

Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD, Dixon AK, Dunne F, Boiani R, Cinti S, Vidal-Puig A, Karpe F, Chatterjee VK, O'Rahilly S. Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes 2003; 52(4):910-7.

Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 2006; 15(2):152-8.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. Circ Res 2000; 87(12):1195-201.

Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. Hypertension 2003; 42(4):664-8.

Schiffrin EL, Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hipertensión. Histochem Cell Biol 2004; 122(4): 339-52.

Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288(3):H1037-43.

Schildknecht S, Ullrich V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. Arch Biochem Biophys 2008.

Schupp M, Lee LD, Frost N, Umbreen S, Schmidt B, Unger T, Kintscher U. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by losartan metabolites. Hypertension 2006; 47(3):586-9.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. Circ Res 2002; 91(5):406-13.

Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. Brain Res Bull 2007; 73(1-3):55-63.

Shearer BG, Patel HS, Billin AN, Way JM, Winegar DA, Lambert MH, Xu RX, Leesnitzer LM, Merrihew RV, Huet S, Willson TM. Discovery of a novel class of PPARdelta partial agonists. Bioorg Med Chem Lett 2008; 18(18):5018-22.

Sheares KK, Jeffery TK, Long L, Yang X, Morrell NW. Differential effects of TGF-beta1 and BMP-4 on the hypoxic induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary artery smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 287(5):L919-27.

Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M, Wen J, Ishibashi M, Kubota T, Egashira K, Takeshita A. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. Circulation 2002; 106(24):3126-32.

Shimokawa H, Matoba T. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. Pharmacol Res 2004; 49(6):543-9.

Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. J Am Coll Cardiol 2003; 42(10):1757-63.

Sidhu JS, Cowan D, Tooze JA, Kaski JC. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces circulating platelet activity in patients without diabetes mellitus who have coronary artery disease. Am Heart J 2004a; 147(6):e25.

Sidhu JS, Kaposzta Z, Markus HS, Kaski JC. Effect of rosiglitazone on common carotid intima-media thickness progression in coronary artery disease patients without diabetes mellitus. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004b; 24(5):930-4.

Siflinger-Birnboim A, Goligorsky MS, Del Vecchio PJ, Malik AB. Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. Lab Invest 1992; 67(1):24-30.

Slice LW, Chiu T, Rozengurt E. Angiotensin II and epidermal growth factor induce cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells through small GTPases using distinct signaling pathways. J Biol Chem 2005; 280(2):1582-93.

Simon AR, Rai U, Fanburg BL, Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. Am J Physiol 1998; 275(6 Pt 1):C1640-52.

Simonin MA, Bordji K, Boyault S, Bianchi A, Gouze E, Bécuwe P, Dauça M, Netter P, Terlain B. PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282(1):C125-33.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacol Rev 2004; 56(3):387-43.

Smith WL, Marnett LJ, DeWitt DL, Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. Pharmacol Ther 1991; 49(3):153-79.

Soares AF, Nosjean O, Cozzone D, D'Orazio D, Becchi M, Guichardant M, Ferry G, Boutin JA, Lagarde M, Géloën A. Covalent binding of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 to PPARgamma. Biochem Biophys Res Commun 2005; 337(2):521-5.

Sommer M, Wolf G. Rosiglitazone increases PPARgamma in renal tubular epithelial cells and protects against damage by hydrogen peroxide. Am J Nephrol 2007; 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. 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 2007; 116(2):163-73.

Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. J Biol Chem 1998; 273(16):9886-93.

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. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. Nature 1998a; 393(6687):790-3.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. Circulation 1998b; 98(19):2088-93.

Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. Diabetes 2005; 54(8):2460-70.

Staels B. PPAR agonists and the metabolic syndrome. Therapie 2007; 62(4):319-26.

Storka A, Vojtassakova E, Mueller M, Kapiotis S, Haider DG, Jungbauer A, Wolzt M. Angiotensin inhibition stimulates PPARgamma and the release of visfatin. Eur J Clin Invest 2008; 38(11):820-6.

Subbaramaiah K, Lin DT, Hart JC, Dannenberg AJ. 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 2001 13; 276(15):12440-8.

Sung B, Park S, Yu BP, Chung HY. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPARgamma activator: suppression of NF-kappaB by 2,4-thiazolidinedione. Exp Gerontol 2006; 41(6):590-9.

Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. Endocrinology 2001a ; 142(7):3125-34.

Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Sato K, Kudo M, Taniyama Y, Ito S. Differential effects among thiazolidinediones on the transcription of thromboxane receptor and angiotensin II type 1 receptor genes. Hypertens Res 2001b; 24(3):229-33.

Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. J Biol Chem. 2007; 282(16):11613-7.

Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, Hamada M, Hiwada K, Horiuchi M. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. Circulation 2002; 106(7):847-53.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. Int J Biochem Cell Biol 2003; 35(6):881-900.

Széles L, Töröcsik D, Nagy L. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. Biochim Biophys Acta 2007; 1771(8):1014-30.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. Hypertension 1997; 29(1 Pt 2):274-9.

Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. J Biol Chem 2006; 281(48):37117-29.

Takano H, Nagai T, Asakawa M, Toyozaki T, Oka T, Komuro I, Saito T, Masuda Y. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes. Circ Res 2000; 87(7):596-602.

Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. Circulation 2000; 102(15):1834-9.

Tamura K, Sakurai T, Kogo H. Relationship between prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis in human vascular endothelial cells. Vascul Pharmacol 2006; 44(6):411-6.

Tanaka M, Umemoto S, Kawahara S, Kubo M, Itoh S, Umeji K, Matsuzaki M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor altered the activation of Cu/Zn-containing superoxide dismutase in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertens Res 2005; 28(1):67-77.

Tang EH, Vanhoutte PM. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. Physiol Genomics 2008; 32(3):409-18.

Taniyama Y, Griendling KK.Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. Hypertension 2003; 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. Antioxidative, antinitrative, and vasculoprotective effects of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist in hypercholesterolemia. Circulation 2003; 108(22):2805-11.

Teissier E, Nohara A, Chinetti G, Paumelle R, Cariou B, Fruchart JC, Brandes RP, Shah A, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. Circ Res 2004; 95(12):1174-82.

Tetsuka T, Baier LD, Morrison AR. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. Evidence for post-transcriptional regulation. J Biol Chem 1996; 271(20):11689-93.

Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, Wilson DW, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Rutledge JC. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. Physiol Genomics 2002; 11(1):21-30.

Thomas B, Berenbaum F, Humbert L, Bian H, Béréziat G, Crofford L, Olivier JL. Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes. Eur J Biochem 2000; 267(23):6798-809.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Pharmacol Rev 2000; 52(4):639-72.

Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Schiffrin EL. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. Hypertension 2001a; 37(2 Part 2):574-80.

Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 2001b; 19(3 Pt 2):553-9.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? Hypertension 2004; 44(3):248-52.

Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. Vascul Pharmacol 2006; 45(1):19-28.

Tozzo E, Ponticiello R, Swartz J, Farrelly D, Zebo R, Welzel G, Egan D, Kunselman L, Peters A, Gu L, French M, Chen S, Devasthale P, Janovitz E, Staal A, Harrity T, Belder R, Cheng PT, Whaley J, Taylor S, Hariharan N. The dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma activator muraglitazar prevents the natural progression of diabetes in db/db mice. J Pharmacol Exp Ther 2007; 321(1):107-15.

Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38(10):1654-61.

Tsuji T, Mizushige K, Noma T, Murakami K, Ohmori K, Miyatake A, Kohno M. Pioglitazone improves left ventricular diastolic function and decreases collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat. J Cardiovasc Pharmacol 2001; 38(6):868-74.

Tu CT, Guo JS, Wang M, Wang JY. Antifibrotic activity of rofecoxib in vivo is associated with reduced portal hypertension in rats with carbon tetrachloride-induced liver injury. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22(6):877-84.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. EMBO J 1992; 11(2):433-9.

Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. Circulation 1999; 100(11):1223-9.

Tuñon J, Ruiz-Ortega M, Egido J. Regulation of matrix proteins and impact on vascular structure. Curr Hypertens Rep 2000; 2 (1): 106-13.

Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R . 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 2007; 101(1):41-56.

Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. Cardiovasc Res 2003; 59(2):488-500.

Umemoto S, Tanaka M, Kawahara S, Kubo M, Umeji K, Hashimoto R, Matsuzaki M. Calcium antagonist reduces oxidative stress by upregulating Cu/Zn superoxide dismutase in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertens Res 2004; 27(11):877-85.

Uracz W, Uracz D, Olszanecki R, Gryglewski RJ. Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. J Physiol Pharmacol 2002; 53(4 Pt 1):643-54.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. J Biol Chem 1998; 273(24):15022-9.

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1999; 274(32):22699-704.

Valentin JP, Jover B, Maffre M, Bertolino F, Bessac AM, John GW. Losartan prevents thromboxane A2/prostanoid (TP) receptor mediated increase in microvascular permeability in the rat. Am J Hypertens 1997; 10(9 Pt 1):1058-63.

Valentine JF, Tannahill CL, Stevenot SA, Sallustio JE, Nick HS, Eaker EY. Colitis and interleukin 1beta up-regulate inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutase in rat myenteric neurons. Gastroenterology 1996; 111(1): 56-64.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998; 38:97-120.

Varo N, Vicent D, Libby P, Nuzzo R, Calle-Pascual AL, Bernal MR, Fernández-Cruz A, Veves A, Jarolim P, Varo JJ, Goldfine A, Horton E, Schönbeck U. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. Circulation 2003; 107(21):2664-9.

Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Liñan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. J Clin Invest 1997; 99(10):2416-22.

Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kübler W, Kreuzer J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20(4):940-8.

Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288(3):H1016-21.

Vila-del Sol V, Fresno M. involvement of TNF and NF-kappa B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages. J Immunol 2005; 174(5):2825-33.

Virdis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. J Pharmacol Exp Ther 2005; 312(3):945-53.

Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. J Biol Chem 2001; 276(47):44258-65.

Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. J Biol Chem 2003; 278(20):17982-5.

Waites CR, Dominick MA, Sanderson TP, Schilling BE. Nonclinical safety evaluation of muraglitazar, a novel PPARalpha/gamma agonist. Toxicol Sci 2007; 100(1):248-58.

Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1-S transition in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2000; 275(29):22435-41.

Wakino S, Kintscher U, Liu Z, Kim S, Yin F, Ohba M, Kuroki T, Schönthal AH, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit mitogenic induction of p21 (Cip1) by modulating the protein kinase Cdelta pathway in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2001; 276(50):47650-7.

Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. Cell 2003; 113(2):159-70.

Wang CH, Ciliberti N, Li SH, Szmitko PE, Weisel RD, Fedak PW, Al-Omran M, Cherng WJ, Li RK, Stanford WL, Verma S. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. Circulation 2004; 109(11):1392-400.

Wang W, Huang XR, Canlas E, Oka K, Truong LD, Deng C, Bhowmick NA, Ju W, Bottinger EP, Lan HY. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. Circ Res 2006a; 98(8):1032-9.

Wang CC, Sharma G, Draznin B. Early growth response gene-1 expression in vascular smooth muscle cells effects of insulin and oxidant stress. Am J Hypertens 2006b; 19(4):366-72.

Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. FASEB J 2004; 18(7):790-804.

Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. Hypertension 2004; 44(4):381-6.

Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, Kodama M, Aizawa Y, Ohta Y, Ono T, Hasegawa G, Naito M, Nakajima T, Kamijo Y, Gonzalez FJ, Aoyama T. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. J Biol Chem 2000; 275(29):22293-9.

Watkins PB, Whitcomb RW. Hepatic dysfunction associated with troglitazone. N Engl J Med 1998; 338(13):916-7.

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. Endocrinology 2001; 142(3):1269-77.

Welch, WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. Hypertension 2008; 52(1):51-6.

Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2003; 100(11): 6712-7.

Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ, Ringel MD, Chen CS. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. Endocr Relat Cancer 2006; 13(2):401-13.

Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M.Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 295(3):H1033-H1043.

Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. J Med Chem 1996; 39(3):665-8.

Wolf K, Castrop H, Hartner A, Goppelt-Strübe M, Hilgers KF, Kurtz A. Inhibition of the renin-angiotensin system upregulates cyclooxygenase-2 expression in the macula densa. Hypertension 1999; 34(3):503-7.

Wong SL, Leung FP, Lau CW, Au CL, Yung LM, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Gollasch M, Huang Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2alpha mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. Circ Res 2009; 104(2):228-35.

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. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 281(5):R1343-60.

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive anddesoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. J Hypertens 2001; 19(4):741-8

Wu L, Wang R, De Champlain J, Wilson TW. Beneficial and deleterious effects of rosiglitazone on hypertension development in spontaneously hypertensive rats. Am J Hypertens 2004; 17(9):749-56.

Wu KK, Liou JY, Cieslik K. Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPbeta. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005a; 25(4):679-85.

Wu S, Gao J, Ohlemeyer C, Roos D, Niessen H, Köttgen E, Gessner R. n. Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes. Free Radic Biol Med 2005b; 39(12):1601-10.

Wu D, Ren Z, Pae M, Guo W, Cui X, Merrill AH, Meydani SN. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. J Immunol 2007; 179(7):4829-39.

Wung BS, Cheng JJ, Hsieh HJ, Shyy YJ, Wang DL. Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. Circ Res 1997; 81(1):1-7.

Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. J Biol Chem 1999; 274(13):9116-21.

Xiong C, Mou Y, Zhang J, Fu M, Chen YE, Akinbami MA, Cui T. Impaired expression of PPAR gamma protein contributes to the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. Life Sci 2005; 77(24):3037-48.

Xu J, Storer PD, Chavis JA, Racke MK, Drew PD. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. J Neurosci Res 2005; 81(3):403-11.

Yamamoto Y, Nakajima M, Yamazaki H, Yokoi T. Cytotoxicity and apoptosis produced by troglitazone in human hepatoma cells. Life Sci 2001; 70(4):471-82.

Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL.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 2000; 275(7):4541-4.

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. Circ Res 2007; 100(10):1442-51.

Yi JH, Park SW, Brooks N, Lang BT, Vemuganti R. PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury via anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. Brain Res 2008; 1244:164-72.

Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. J Biol Chem 2000; 275(16):11706-12.

Yu JG, Javorschi S, Hevener AL, Kruszynska YT, Norman RA, Sinha M, Olefsky JM. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. Diabetes 2002; 51(10):2968-74.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. Hypertension 1998; 32(3):488-95.

Zahradka P, Werner JP, Buhay S, Litchie B, Helwer G, Thomas S. NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. J Mol Cell Cardiol 2002; 34(12):1609-21.

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. Hypertension 2000; 35(5):1055-61.

Zerrouk A, Auguet M, Chabrier PE. Augmented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. J Cardiovasc Pharmacol 1998; 31(4):525-33.

Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. Mol Endocrinol 1996; 10(11):1457-66.

Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades RA. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19(2):324-32.

Zhang J, Fang NY, Gao PJ, Wu LY, Han WQ, Guo SJ, Shen WL, Zhu DL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists attenuate angiotensin II-induced collagen type I expression in adventitial fibroblasts. Clin Exp Pharmacol Physiol 2008; 35(1):72-7.

Zhang Z, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD, DuBois RN. Posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 in rat intestinal epithelial cells. Neoplasia 2000; 2(6):523-30.

Zhao RZ, Chen X, Yao Q, Chen C. TNF-alpha induces interleukin-8 and endothelin-1 expression in human endothelial cells with different redox pathways. Biochem Biophys Res Commun 2005; 327(4):985-92.

Zhao Y, Patzer A, Herdegen T, Gohlke P, Culman J. 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 2006; 20(8):1162-75.

Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. Mol Cell Biochem 2008; 317(1-2):43-50.

Zhao Z, Geng J, Ge Z, Wang W, Zhang Y, Kang W. Activation of ERK5 in angiotensin II-induced hypertrophy of human aortic smooth muscle cells. Mol Cell Biochem 2009; 322(1-2):171-8.

Zhou MS, Adam AG, Jaimes EA, Raij L. In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. Hypertension 2003; 42(5):945-51.

Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA. 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 2003; 171(12):6827-37.