

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Mecanismos implicados en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en pacientes obesos mórbidos y en un modelo animal de resistencia a la insulina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Santos-Ruiz Rodríguez-Arias

Directora

Mariam El Assar de la Fuente

Madrid 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina



**MECANISMOS IMPLICADOS EN LA DISFUNCIÓN
ENDOTELIAL ASOCIADA A LA RESISTENCIA A LA INSULINA
EN PACIENTES OBESOS MÓRBIDOS Y EN UN MODELO
ANIMAL DE RESISTENCIA A LA INSULINA**

Memoria para optar al título de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Presenta:

Marta Santos-Ruiz Rodríguez-Arias

Directora:

Dra. Mariam El Assar de la Fuente

Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Getafe

Madrid, 2018

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

La realización de una tesis doctoral es un trabajo que no es posible sin el apoyo de numerosas personas a las que quiero expresar mi gratitud.

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento de manera muy especial a la Doctora Mariam El Assar de la Fuente, mi directora de Tesis, que con paciencia y tesón me ha guiado en la realización de esta tesis. De la misma manera quiero agradecer también a mi tutor de Tesis, el Doctor Manuel Benito, por su apoyo constante y generosidad en el tiempo dedicado a lo largo de estos años. Sin las enseñanzas, orientación, seguimiento y supervisión de los dos no hubiera sido posible la finalización de este proyecto.

Especial reconocimiento merece también el Doctor Leocadio Rodríguez Mañas, la Doctora María Jesús Gaspar y la Doctora Pilar Iniesta. Mi más sincera gratitud a los tres por ayudarme a entrar en el mundo de la Bioquímica e impulsarme en mi formación como investigadora, tanto en el Hospital como en la Universidad.

También quiero dar las gracias al Doctor Javier Angulo, por el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias y apoyo recibidos, que tanto han ayudado a la finalización de la presente tesis.

Mi gratitud a Alberto Sánchez Ferrer por sus enseñanzas sobre el manejo de animales de experimentación, con mucha paciencia y dedicación, y a Antonio Ferreruelo por su inestimable ayuda con la informática.

Gracias a todos los miembros de la Fundación para la Investigación Biomédica y a todas las personas que componen el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Getafe por su apoyo a lo largo de estos años. En especial quiero mostrar mi agradecimiento a Patricia Fernández, Isabel Miranda, Olha Stelmack, Rocío Fernández, Lucía Prados, Carmen Carrasco, Arantxa López, Carmen Martín y Mariano Massotti. Gracias por creer en mí. Sin vuestro ejemplo de profesionalidad, vuestros consejos, amistad y apoyo incondicional este proyecto no hubiera sido posible. También quisiera dar las gracias a los miembros del Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario

de Getafe, por facilitarnos las muestras de tejido para realizar los estudios en microvasos humanos.

Quiero mostrar mi agradecimiento también a todas mis compañeras de Dirección Técnica de Megalab por su apoyo y cariño en el final de mi Tesis. Amapola Siguín, Nuria Soriano, Dolores Sánchez, María Pérez, Raquel Piqueras, Susana Cuesta, Cristina Martínez y Cristina Dacosta, gracias por vuestra comprensión, compañerismo, vuestro ejemplo de trabajo constante y profesionalidad en el día a día. Gracias por permitirme compaginar tan bien mi trabajo en el laboratorio con la finalización de este proyecto. Habéis sido imprescindibles para mí en el final de mi Tesis Doctoral.

A Mercedes Valdemoro, por ser un referente para mí como especialista en el laboratorio y como persona. Gracias por tus enseñanzas científicas y humanas, por tu ejemplo y tu amistad.

A todos mis amigos farmacéuticos: Bárbara Arquillo, Blanca Bertrán de Lis, Patricia Gabisch, Elena Gallego, Sonia Gómez, Teresa Guillamón, Gisela Linares, Ana de Rivas, María Vicente, Ángel Yuste y Marta Zapatero, gracias por acompañarme en mi formación y demostrarme siempre vuestra amistad. Y de manera muy especial gracias a María Brañas y Macarena Torrego, por su apoyo incondicional, su confianza, sus constantes palabras de ánimo, y cariño durante la preparación de mi tesis y en el resto de momentos compartidos.

Gracias también a Diego Mazón por enseñarme el significado de la cita que encabeza este trabajo.

Y he querido dejar lo más importante para el final. Quiero expresar mi mayor gratitud a toda mi familia. Si he llegado al final de este proyecto es gracias al apoyo, la comprensión y el cariño de mis padres y hermanos. A mis padres, Miguel y Marta, por dedicar su vida entera para darnos lo mejor. Y a mis hermanos Carlos, Carmen y Begoña, por saber que estáis siempre a mi lado pase lo que pase. Ellos son lo más importante en mi vida y por

eso quiero dedicarles la presente tesis doctoral. Gracias también a mis abuelos Carlos y Marisa por su ejemplo de trabajo constante, generosidad y dedicación a la familia. Y a todos mis tíos y primos, en especial a mis padrinos Isabel y Eduardo, por su cariño y apoyo. Me siento afortunadísima de tenerlos a todos siempre conmigo.

Y por último quiero dedicar un recuerdo muy especial a mis abuelos Ángel y Carmen, que seguro que sonrían desde el cielo al ver iniciado mi camino en la Bioquímica. Sé que a mi abuelo le hubiera gustado mucho saber que soy Especialista en Bioquímica Clínica y verme defender mi Tesis, en este Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia que tanto quiso y del que tanto nos habló. Para él, su familia y la Bioquímica fueron lo más importante y a lo que dedicó por entero su vida, siendo un referente en la Bioquímica Española, en la Ciencia, en la Universidad y en nuestra familia. Contó siempre con el apoyo y comprensión constante de mi abuela. Sin ella, siempre en un discreto segundo plano, pero con un papel fundamental; ninguno de los éxitos conseguidos, hubieran sido posibles. Fue mucho lo que consiguieron juntos. Espero que el legado humano y científico tan importante que nos han dejado me sirva siempre como referente para ir mejorando cada día.

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan sólo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”

Santa Teresa de Calcuta (1910-1997)

Los resultados de la presente tesis han sido publicados en:

El Assar, M., Angulo, J., Santos-Ruiz, M., Ruiz de Adana, J. C., Pindado, M. L., Sánchez-Ferrer, A., Hernández, A., & Rodríguez-Manas, L. (2016). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) elevation and arginase up-regulation contribute to endothelial dysfunction related to insulin resistance in rats and morbidly obese humans. *J Physiol*, 594(11), 3045-3060.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | I |
| RESUMEN | V |
| SUMMARY | IX |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| <i>La obesidad: Un problema epidémico</i> | 2 |
| <i>La obesidad y su asociación con el riesgo cardiovascular</i> | 6 |
| <i>Obesidad y resistencia a la insulina</i> | 9 |
| <i>Resistencia a la insulina como factor de riesgo cardiovascular</i> | 12 |
| <i>Endotelio vascular</i> | 14 |
| Factores vasodilatadores derivados del endotelio..... | 15 |
| Óxido Nítrico (NO)..... | 15 |
| Prostaciclina (PGI ₂)..... | 18 |
| Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)..... | 18 |
| Factores vasoconstrictores derivados del endotelio..... | 19 |
| Endotelina-1..... | 19 |
| Tromboxano A ₂ | 20 |
| Angiotensina II..... | 20 |
| <i>Disfunción endotelial</i> | 21 |
| <i>Mecanismos implicados en disfunción endotelial asociada a resistencia a la insulina y obesidad</i> | 21 |
| Estrés oxidativo..... | 22 |
| Contribución del estrés oxidativo a la disfunción endotelial..... | 23 |
| Fuentes de estrés oxidativo..... | 24 |
| Xantina oxidasa..... | 24 |
| NADPH oxidasa..... | 25 |
| Cadena de transporta mitocondrial..... | 26 |
| Desacoplamiento de la NOS..... | 27 |
| Alteración de la vía del óxido nítrico..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| Disminución de la biodisponibilidad de L-arginina | 30 |
| Aumento de la arginasa | 32 |
| Aumento del ADMA | 33 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 36 |
| <i>Hipótesis</i> | 37 |
| <i>Objetivos generales</i> | 37 |
| <i>Objetivos específicos</i> | 38 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 39 |
| <i>Material biológico</i> | 40 |
| Muestras de sujetos | 40 |
| Criterios de inclusión | 40 |
| Criterios de exclusión | 40 |
| Obtención de muestras | 41 |
| Muestras de animales de experimentación | 42 |
| Modelo de resistencia a la insulina | 42 |
| Obtención de muestras..... | 42 |
| <i>Estudios de reactividad vascular en microvasos - Miógrafo de Mulvany</i> | 44 |
| Arterias de grasa visceral humana | 44 |
| Protocolo experimental..... | 44 |
| Arterias mesentéricas de rata | 46 |
| Protocolo experimental..... | 46 |
| <i>Estudios de reactividad vascular en segmentos aórticos- Baño de órganos</i> | 47 |
| <i>Protocolos de la modulación farmacológica de las vías de producción de estrés oxidativo y L-arginina/NO</i> | 50 |
| <i>Estudios bioquímicos</i> | 51 |
| Determinaciones en sangre..... | 51 |
| Determinaciones en tejido aórtico de rata | 52 |
| Cuantificación de proteínas (método BCA) | 52 |

| | |
|--|-----------|
| Determinación de los niveles de ADMA, DDAH1 y arginina | 53 |
| Determinación de la actividad de arginasa en aorta..... | 53 |
| Determinaciones en grasa visceral de sujetos obesos mórbidos..... | 54 |
| Detección in situ del anión superóxido | 54 |
| Protocolo experimental..... | 55 |
| <i>Análisis de la expresión génica en vasos humanos</i> | <i>57</i> |
| Extracción de ARN | 57 |
| Transcripción Reversa (RT) | 58 |
| PCR en Tiempo Real..... | 58 |
| Protocolo experimental..... | 60 |
| <i>Análisis estadístico.....</i> | <i>61</i> |
| RESULTADOS | 62 |
| <i>Impacto de la obesidad y la resistencia a la insulina sobre la función vascular humana.....</i> | <i>63</i> |
| Características generales de los sujetos..... | 63 |
| La disfunción endotelial en sujetos obesos mórbidos se asocia con la presencia de resistencia a la insulina..... | 65 |
| <i>Impacto de la resistencia a la insulina sobre la función vascular en un modelo animal</i> | <i>69</i> |
| La función endotelial está deteriorada en arterias procedentes de RRI no obesas | 70 |
| <i>Mecanismos implicados en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en un modelo animal</i> | <i>71</i> |
| La disfunción endotelial se asocia con presencia de estrés oxidativo en OM-RI y RRI..... | 71 |
| La reducción del estrés oxidativo mitocondrial mejora las respuestas vasodilatadoras en OM-RI y en aortas de RRI. | 76 |
| La inhibición de la NADPH oxidasa no modifica las respuestas vasodilatadoras en OM-RI, pero si potencia la relajación en los vasos de pequeño calibre en RRI. | 79 |

| | |
|--|------------|
| El cofactor de la NOS no modifica las respuestas vasodilatadoras en sujetos obesos mórbidos y sí mejora la disfunción endotelial en aorta de RRI | 81 |
| Alteración de la vía L-arginina/NO en sujetos obesos mórbidos y en ratas | 84 |
| El incremento del sustrato de la NOS mejora la relajación endotelio-dependiente en sujetos OM-RI y en RRI..... | 84 |
| La elevación de ADMA se asocia con la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en RRI | 88 |
| El incremento de la actividad de arginasa se propone como mecanismo implicado en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en ratas..... | 92 |
| DISCUSIÓN | 96 |
| <i>La Disfunción endotelial se asocia con el estrés oxidativo en sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina y en ratas resistentes a la insulina</i> | <i>101</i> |
| <i>La alteración de la vía de L-arginina/ NO contribuye al deterioro de la vasodilatación endotelial asociada a la resistencia a la insulina</i> | <i>106</i> |
| CONCLUSIONES | 113 |
| BIBLIOGRAFÍA | 116 |
| ANEXO 1..... | 141 |
| ANEXO 2..... | 158 |

ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclasa

ACh: acetilcolina

ADMA: dimetilarginina asimétrica

ADN_c: ácido desoxirribonucleico complementario

AMP_c: adenilato monofosfato cíclico

ARN: ácido ribonucleico

ARN_m: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosin trifosfato

BH₂: dihidrobiopterina

BH₃: trihidrobiopterina

BH₄: tetrahidrobiopterina

BK: bradiquinina

Cl: cloro

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

COX: cicloxigenasa

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

DDAH: dimetilarginina dimetilaminohidrolasa

DDAH-1: dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1

DDAH-2: dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 2

DHE: dihidroetidio

DM: diabetes mellitus

DMSO: dimetil sulfóxido

DUOX: enzima dual oxidasa

ECV: enfermedad cardiovascular

EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EDRF: factor relajante derivado del endotelio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EETs: epoxyeicosatrienoicos

eNOS, NOS3: óxido nítrico sintasa endotelial

FAD: flavina adenina dinucleótido

FMN: flavin mononucleótido

GC: guanilato ciclasa

GMP_c: guanosin monofosfato cíclico

GTP: guanosín trifosfato

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

H₂S: sulfuro de hidrógeno

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HDL: lipoproteína de alta densidad

Hg: mercurio

HOMA-IR: *Homeostasis Model of Assessment for Insulin Resistance*

IL-6: interleuquina 6

IMC: índice de masa corporal

iNOS, NOS2: óxido nítrico sintasa inducible

IRS-1: primer sustrato del receptor de insulina

kg: kilogramo

KHS: Krebs-Henseleit

kPa: kilopascal

LDL: lipoproteína de baja densidad

m²: metro cuadrado

mitoTEMPO: cloruro de (2-(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-oxil-4-ilamino)-2-oxoetil)

trifenilfosfonio

mM: milimolar

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NE: norepinefrina

nNOS, NOS1: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

nor-NOHA: N ω -hidroxi-nor-arginina

NOS: óxido nítrico sintasa

NOX: enzima NADPH oxidasa

NPS: nitroprusiato sódico

O₂^{-•}: anión superóxido

O₂: oxígeno

OM-NRI: obesos mórbidos no resistentes a la insulina

OM-RI: obesos mórbidos resistentes a la insulina

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO⁻: peroxinitrito

PAT: tonometría periférica arterial

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGH₂: prostaglandina H₂

PGI₂: prostaciclina

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa

PKG: proteína quinasa G

RC: rata control

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas del oxígeno

RPM: revoluciones por minuto

RRI: ratas resistentes a la insulina

RT: transcripción reversa

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio De la Obesidad

SOD: superóxido dismutasa

TEMPOL: 1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidina

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa

VAS 2870: 3-Benzil-7-(2-benzoxazolil) tio-1,2,3-triazolo(4,5-d) pirimidina

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

RESUMEN

En la actualidad, la obesidad es considerada una enfermedad crónica, multifactorial y uno de los principales problemas de salud de nuestro siglo, alcanzando cifras epidémicas en los países desarrollados. La obesidad, un importante factor de riesgo cardiovascular, se relaciona estrechamente con la presencia de resistencia a la insulina (RI). Esta alteración metabólica juega un papel fundamental en el desarrollo de la disfunción endotelial y podría ser un factor determinante para explicar cómo la obesidad puede favorecer el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV). El mejor conocimiento de los mecanismos subyacentes de la disfunción endotelial asociada a la RI en sujetos obesos mórbidos (OM) permitirá establecer estrategias farmacológicas dirigidas a intervenir sobre estos mecanismos y reducir el riesgo de padecer ECV.

Los objetivos generales del presente trabajo fueron: 1) determinar el papel de la RI en la disfunción endotelial en humanos OM y en un modelo animal de RI sin obesidad y, 2) evaluar los posibles mecanismos implicados en la disfunción endotelial asociada a la RI, particularmente los relacionados con el estrés oxidativo y la alteración de la vía de L-arginina/ NO.

El estudio fue realizado en 41 sujetos OM con un IMC ≥ 40 kg/m² de edades comprendidas entre 26 y 65 años sin ECV. Se dividieron los sujetos en dos grupos de acuerdo al índice HOMA-IR: 1- Sujetos obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI; HOMA-IR < 3,8), y 2- sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI; HOMA-IR $\geq 3,8$). Por otro lado, se estudiaron 5 sujetos sanos no obesos (grupo control) con IMC: 20-29 kg/m². Los microvasos se obtuvieron de especímenes de grasa visceral de los sujetos OM sometidos a cirugía bariátrica. El modelo de RI en animales se obtuvo tratando ratas Sprague- Dawley de 4 semanas de edad con fructosa disuelta en agua de bebida al 20 por ciento durante 8 semanas. Tras el tratamiento, se obtuvieron la aorta y los microvasos mesentéricos. En los vasos obtenidos, se realizaron estudios de evaluación funcional utilizando el miógrafo de Mulvany y el baño de órganos. Para la evaluación de las vías de producción de estrés oxidativo y de L-arginina/ NO algunos segmentos arteriales fueron preincubados con distintos fármacos durante 30 minutos antes de la evaluación de la respuesta vasodilatadora inducida por BK en humanos o

ACh en ratas. Por otro lado, se realizaron estudios bioquímicos, para la determinación de los niveles circulantes de glucosa, insulina, ADMA, y arginina tanto en humanos como en ratas. Las concentraciones de ADMA y arginina también se determinaron en grasa visceral de sujetos OM y en el homogenizado aórtico de ratas empleando ensayos comerciales. Para la detección de anión superóxido en cortes histológicos de microvasos mesentéricos procedentes de sujetos OM se empleó la sonda dihidroetidio. Por último, se evaluó la expresión de ARNm de eNOS, DDAH-1, DDAH-2 y arginasa-2 en arterias de grasa visceral de sujetos OM mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando sondas TaqMan.

En sujetos OM el deterioro de las relajaciones dependientes de endotelio inducidas por BK se asoció con la presencia de RI. Además, se observó una significativa correlación inversa entre la RI (índice HOMA-IR) y la vasodilatación endotelial (valores de pD2 para BK) en los sujetos obesos. De modo similar a lo observado en los sujetos OM-RI, las ratas tratadas con fructosa, a pesar de no desarrollar obesidad, muestran hiperglucemia, hiperinsulinemia y un elevado índice HOMA-IR con respecto a las ratas control. Estas alteraciones metabólicas se acompañaron de una reducida respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente tanto en vasos de conductancia (aorta) como de resistencia (microarterias mesentéricas). Una mejoría en las relajaciones dependientes de endotelio después del tratamiento con el detoxificador de anión superóxido, SOD, o con su mimético, TEMPOL, se observó en vasos humanos y de rata en presencia de RI. En sujetos OM-RI el barredor de anión superóxido de origen mitocondrial, mitoTEMPO, provocó una disminución en la producción vascular de superóxido detectada mediante la sonda dihidroetidio, y un aumento en la relajación endotelial. En ratas, el mitoTEMPO fue eficaz solamente en aortas procedentes de ratas resistentes a la insulina (RRI). Aunque el inhibidor de la NADPH oxidasa, VAS 2870, no produjo efecto en vasos de sujetos OM, mejoró la vasodilatación en microvasos mesentéricos de RRI. En humanos, la preincubación de los segmentos vasculares con el cofactor de la enzima NOS, BH₄, no tuvo efecto significativo sobre la función endotelial, mientras que en aortas de RRI el BH₄ sí mejoró la vasorelajación. Las relajaciones defectuosas observadas en sujetos OM-RI mejoraron en presencia del sustrato de la NOS, L-arginina, a pesar de no detectar diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de L-arginina entre ambos

grupos de sujetos OM. Más aún, un aumento en la concentración de ADMA, inhibidor competitivo endógeno de la NOS, se detectó en suero y tejido adiposo de sujetos OM-RI. Los niveles séricos de ADMA se correlacionaron positivamente con el índice HOMA-IR y negativamente con los valores de pD2 para BK. Los estudios de expresión génica revelaron una disminución en la expresión de ARNm de las enzimas responsables de degradación del ADMA, DDAH-1 y 2, y un aumento en la expresión de la arginasa 2, responsable de la degradación de L-arginina. La inhibición de la arginasa alivió la disfunción endotelial en sujetos OM-RI. En RRI, se confirmó la presencia de altos niveles de ADMA en suero y en tejido aórtico, y una reducida expresión de DDAH1, junto a un aumento en la actividad de arginasa. Los estudios funcionales en presencia de L-arginina y el inhibidor de arginasa (nor-NOHA) corroboraron los hallazgos moleculares.

Estos resultados revelan el impacto determinante de la RI sobre la función endotelial e identifican la presencia de estrés oxidativo y la alteración de la vía L-arginina/NO como mecanismos implicados en este impacto tanto en sujetos OM como en un modelo animal. La caracterización de estos mecanismos permite establecer potenciales objetivos terapéuticos de intervención para paliar o aliviar la disfunción endotelial asociada a la RI y, por tanto, retrasar la aparición de sus consecuencias, como son las relacionadas con la ECV.

SUMMARY

Currently, obesity is considered a chronic, multifactorial disease and one of the main health problems of our century, reaching epidemic proportions in developed countries. Obesity, an important cardiovascular risk factor, is closely related to the presence of insulin resistance (IR). This metabolic alteration plays a key role in the development of endothelial dysfunction and it might be a determinant factor to explain how obesity may favor cardiovascular disease (CVD) development. The best knowledge of the underlying mechanisms of endothelial dysfunction associated with IR in morbidly obese (MO) subjects will allow to establish potential therapeutic targets for intervention and therefore to reduce the risk of presenting CVD.

The general objectives of the present work were: 1) to determine the role of IR in the endothelial dysfunction in MO subjects and in a non-obese IR animal model and, 2) to evaluate the possible mechanisms involved in the endothelial dysfunction associated with IR, particularly those related to oxidative stress and to the alteration of the L-arginine/ NO pathway.

The study was realized in 41 MO subjects with a $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$, aged between 26 and 65 years and without CVD. Subjects were distributed into two groups according to the HOMA-IR score: 1- non-insulin resistant morbidly obese subjects (NIR-MO; $HOMA-IR < 3,8$), and 2- insulin resistant morbidly obese subjects (IR-MO; $HOMA-IR \geq 3,8$). On the other hand, 5 non-obese healthy subjects (control group) with IMC: $20-29 \text{ kg/m}^2$ were studied. Microvessels were isolated from visceral fat obtained from MO subjects who underwent bariatric surgery. The IR animal model was obtained treating 4-week old Sprague-Dawley rats with 20 % of fructose dissolved in drinking water for 8 weeks. After the treatment, the aorta and mesenteric microvessels were obtained. In the isolated vessels, studies of functional evaluation were realized using the Mulvany Myograph and the organ baths. To evaluate the pathways of oxidative stress production and L-arginine /NO some arterial segments were incubated with different drugs during 30 minutes before evaluating vasodilatation response induced by BK in human beings or by ACh in rats. On the other hand, biochemical studies were realized to determine circulating levels of glucose, insulin, ADMA, and arginine both in human beings and in rats. ADMA

and arginine concentrations were also evaluated in visceral adipose tissue from MO subjects and in aortic tissue extracts of rats using commercial assays. Dihydroethidium dye was used for superoxide anion detection in mesenteric arterial histological sections proceeding from MO subjects. Finally, mRNA gene expression of eNOS, DDAH-1, DDAH-2 and arginase-2 was evaluated in visceral arteries of MO subjects by real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes.

Impaired endothelium-dependent vasodilation induced by BK in MO subjects was associated with the presence of IR. Furthermore, a significant inverse correlation was observed between IR (HOMA-IR index) and endothelial vasodilatation (BK pD2 values) in obese subjects. Similar to that observed in IR-MO subjects, rats treated with fructose, despite not displaying obesity, showed hyperglycemia, hyperinsulinemia and a higher HOMA-IR score when compared to control rats. These metabolic alterations were accompanied by a defective endothelium-dependent vasodilatation in both conductance (aorta) and resistance (mesenteric micro-arteries) vessels. Defective endothelial vasodilation associated to IR was improved in human and rat vessels after the treatment with the superoxide scavenger, SOD, or with its mimetic, TEMPOL. In IR-MO subjects the superoxide scavenger targeted to the mitochondria, mitoTEMPO, reduced vascular superoxide generation detected by the dihydroethidium probe, and increased endothelial relaxation. In rats, mitoTEMPO was effective only in aorta from insulin resistant rats (IRR). Although the NADPH oxidase inhibitor, VAS 2870, did not have effect in vessels from MO subjects, it improved endothelial vasodilations in mesenteric microvessels from IRR. In humans, the NOS cofactor, BH₄, did not have significant effect on endothelial function, while in aorta from IRR the treatment with BH₄ improved the vasodilatation. Defective endothelial vasodilatation in IR-MO subjects improved in the presence of NOS substrate, L-arginine, despite not detecting significant differences in the plasmatic L-arginine concentrations between both groups of MO subjects. Even more, an increase in the concentration of the endogenous NOS inhibitor, ADMA, was detected in serum and adipose tissue of IR-MO subjects. Serum ADMA concentrations were positively correlated with HOMA-IR score and inversely correlated with pD2 values for BK. Gene expression studies revealed decreased expression of mRNA of ADMA degrading enzymes, DDAH1 and 2, and increased expression of arginase

2, responsible for L-arginine degradation. Arginase inhibition improved endothelial function in IR-MO subjects. In IRR, it was confirmed the presence of an elevation of ADMA concentrations in serum and in aortic tissue, as well as reduced DDAH-1 aortic content and increased aortic arginase activity. Functional studies in the presence of L-arginine and arginase inhibitor (nor-NOHA) corroborated the molecular finds.

These results reveal the determinant impact of IR on endothelial function and identify the presence of oxidative stress and the alteration of the L-arginine/NO pathway as mechanisms involved in this impact in MO subjects and in an animal model of IR. The characterization of these mechanisms allows to establish potential therapeutic targets for intervention to restore or alleviate the endothelial dysfunction associated with IR and, therefore, to delay the appearance of its consequences such as those related to CVD.

INTRODUCCIÓN

La obesidad: Un problema epidémico

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define obesidad como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” (OMS, 2015b). En otras palabras, la obesidad es considerada como un desorden metabólico crónico caracterizado por un aumento en el número y/o tamaño de las células del tejido adiposo (Oliveros et al., 2014).

Para la clasificación de la obesidad, la OMS (OMS, 2016), la *Internacional Obesity Task Force* (ICO, 2010), el *Expert Panel on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults* (NIH, 2000) y las sociedades científicas, recurren a estimar el porcentaje de grasa corporal a partir de datos antropométricos. En este sentido, el índice de masa corporal (IMC) es el método más utilizado y aceptado para clasificar y definir la obesidad, que se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2).

La OMS determina sobrepeso como un IMC igual o superior a 25, y obesidad para un IMC igual o superior a 30, existiendo a su vez subclasificaciones dentro de estos rangos como se muestra a continuación en la **Tabla 1** (OMS, 2014):

| Clasificación del IMC según la OMS | |
|------------------------------------|-------------|
| Insuficiencia ponderal | < 18,5 |
| Intervalo normal | 18,5 - 24,9 |
| Sobrepeso | ≥ 25 |
| Preobesidad | 25,0 - 29,9 |
| Obesidad | ≥ 30 |
| Obesidad clase I | 30,0 - 34,9 |
| Obesidad clase II | 35,0 - 39,9 |
| Obesidad clase III | $\geq 40,0$ |

Tabla 1. Clasificación del IMC según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Además, existen otras clasificaciones como la llevada a cabo por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) que añade a la clasificación propuesta por la

OMS una subdivisión del sobrepeso en dos categorías e incluye un grado más de obesidad (extrema) para los pacientes con IMC igual o superior a 50 kg/m² como se recoge en la **tabla 2** (SEEDO, 2017):

| Clasificación del IMC según la SEEDO | |
|--------------------------------------|-------------|
| Peso insuficiente | < 18,5 |
| Normopeso | 18,5 - 24,9 |
| Sobrepeso grado I | 25 - 26,9 |
| Sobrepeso grado II (preobesidad) | 27 - 29,9 |
| Obesidad de tipo I | 30,0 - 34,9 |
| Obesidad de tipo II | 35 - 39,9 |
| Obesidad de tipo III (mórbida) | 40 - 49,9 |
| Obesidad de tipo IV (extrema) | ≥ 50 |

Tabla 2. Clasificación del IMC según la Sociedad Española para el Estudio De la Obesidad (SEEDO).

En 2013, *The American Medical Association House of Delegates* declaró la obesidad como enfermedad (AMA, 2013). En la actualidad, la obesidad es considerada una enfermedad crónica, multifactorial, cuya presencia depende en un 30-40% de factores genéticos y en un 60-70% de factores ambientales como la alimentación o el estilo de vida (Pi-Sunyer, 2002). Así, el estilo de vida sedentario y la dieta inadecuada en los países desarrollados hacen que el sobrepeso se considere el sexto factor de riesgo más importante en el desarrollo de una enfermedad asociada (Haslam & James, 2005). Sin embargo, Japón es una excepción ya que, aunque se trata de un país desarrollado, es el único en el que el porcentaje de obesos no alcanza cifras epidémicas (**Figura 1**). Probablemente esto es debido a su dieta saludable y a su excelente red de transporte público, favoreciendo el aumento de la actividad física y la reducción del sedentarismo. El bajo porcentaje de obesos y los hábitos saludables de la mayoría de su población confiere a Japón ser el país con más esperanza de vida del mundo. Sin embargo, en el resto de países desarrollados la obesidad es considerada un problema aún sin resolver. De hecho, y a pesar de la información disponible de la relación existente entre la obesidad y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, los países desarrollados no han sido capaces de reducir las tasas de obesidad de forma satisfactoria en los últimos 33 años (Ortega et al., 2016).

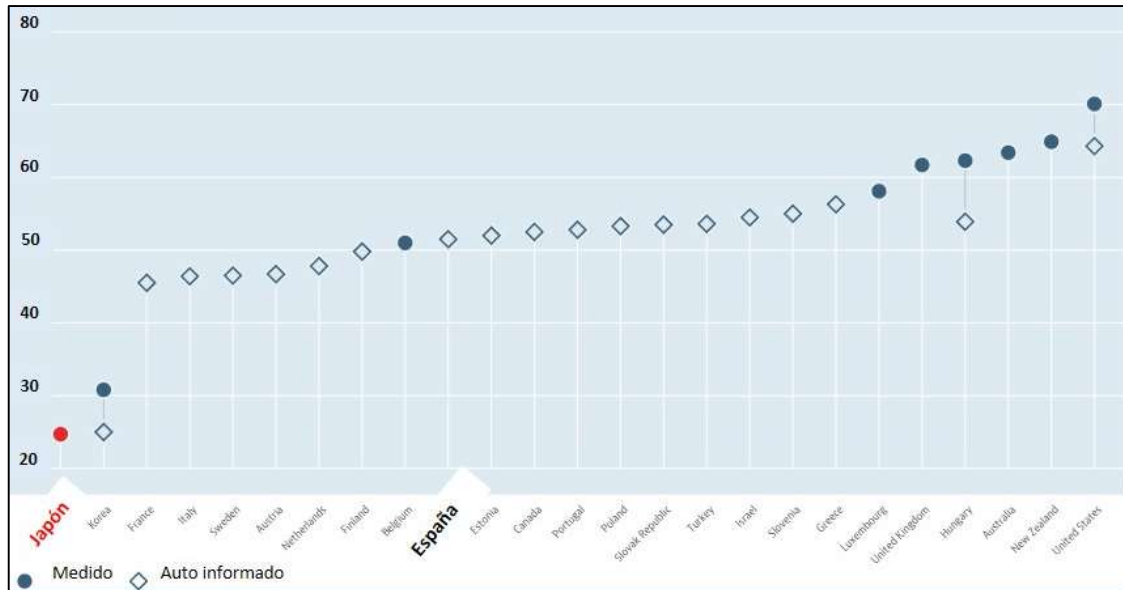


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de la población de 15 o más años procedentes de diferentes países desarrollados con sobrepeso u obesidad. Con un rombo se representa el porcentaje de sujetos cuyos datos de IMC fueron "auto informados" de las encuestas de salud basadas en la población. Con un círculo se representan los datos "medidos" de IMC (estimaciones precisas de la estatura y el peso de los exámenes médicos). En rojo se resalta el porcentaje de sujetos con sobrepeso u obesidad en Japón, cuyo valor es notablemente inferior al del resto de países. Esta figura ha sido adaptada de Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), cuyos datos fueron actualizados en 2014.

La obesidad, por tanto, es considerada uno de los principales problemas de salud de nuestro siglo, alcanzando cifras epidémicas en los países desarrollados (Hossain et al., 2007). Según los últimos datos aportados por la OMS, en su nota descriptiva relativa a la obesidad, la prevalencia mundial de esta enfermedad se había multiplicado por más de dos entre 1980 y 2014. Concretamente, en el año 2014 se contabilizaron más de 1900 millones de adultos de 18 o más años con sobrepeso, de los cuales al menos 600 millones eran obesos. Estos datos representaban un 13% del total de la población mundial, siendo un 11% hombres y un 15% mujeres. Más aún, los valores relativos al sobrepeso fueron aún mayores, ascendiendo a un 39% de la población adulta de 18 o más años (38% de los hombres y un 40% de las mujeres) (OMS, 2015b). En 2015, un total de 107,7 millones de niños y 603,7 millones de adultos eran obesos (Afshin et al., 2017). En relación al futuro, *The Organisation for Economic Co-operation and Development* calcula que en el año 2020 dos de cada tres individuos presentarán obesidad o sobrepeso en algunos países (OECD, 2012).

En España, las cifras de obesidad son también alarmantes. Según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE), el porcentaje de obesos (IMC \geq 30 Kg/m²) en la población española alcanza un 17,3%. Estas prevalencias son superiores a las observadas en el resto de población de la Comunidad Europea (13,9%), y con respecto a la población extranjera del resto del mundo (15,9%) (INE, 2011-2012a). Por otro lado, publicaciones recientes avalan que el porcentaje de obesos en nuestro país ha aumentado de forma más lenta en los últimos cinco años, de modo similar a lo observado en otros países (Canadá, Inglaterra, Italia y Corea) cuya tasa de obesidad manifiesta cierta estabilidad o un crecimiento más moderado que en épocas anteriores (OECD, 2014).

En cuanto al sexo, también existen diferencias en España, siendo el porcentaje de hombres obesos (17,1%) superior al de mujeres obesas (16,7%) (INE, 2014). Por otro lado, la obesidad en España es más prevalente en personas con menor nivel educativo. En este sentido, el porcentaje de obesos alcanza un 21,9% en sujetos de nivel educativo que incluye preescolar, primaria y secundaria de primera etapa; un 13,4% de sujetos obesos con estudios de secundaria de segunda etapa y postsecundaria no superior; y por último solo un 9,8% de sujetos obesos con estudios de educación superior (INE, 2011-2012b).

Una consecuencia dramática del aumento de la obesidad, es la disminución en la esperanza de vida debido a los trastornos cardiovasculares asociados a la obesidad y a un aumento de morbilidad en sujetos obesos (Fontaine et al., 2003; Olshansky et al., 2005). En efecto, cada año mueren, como mínimo, 2,8 millones de personas en el mundo a causa de la obesidad o sobrepeso (OMS, 2014). Además del problema de salud pública, es importante resaltar la elevada carga económica para los sistemas de salud que supone la obesidad. Durante el año 2007, los costes sanitarios atribuidos a la obesidad ascendían a valores comprendidos entre un 2% y un 7% en países del primer mundo (Hossain et al., 2007). Estos valores presentan una tendencia al alza en los últimos años, siendo también importante destacar que, además de los gastos directos o médicos, existen multitud de costes indirectos que se asocian a la obesidad y que suponen una carga económica significativa para la sociedad (Spieker & Pyzocha, 2016).

Por todo lo anterior, puede afirmarse que la obesidad es uno de los mayores retos de la salud pública para el siglo XXI. Por tanto, existe una necesidad urgente de tomar medidas de salud pública a nivel nacional y global para prevenir la prevalencia, incidencia y carga económica que supone la obesidad en la sociedad (Tremmel et al., 2017).

La obesidad y su asociación con el riesgo cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) es considerada la primera causa de muerte en los países desarrollados. En 2012, 17,5 millones de muertes fueron causadas por ECV alcanzando el 31,1% de muertes registradas en todo el mundo (OMS, 2015a). Según los datos disponibles en el año 2015, la prevalencia de muerte por causa cardiovascular aumentó respecto a 2012, debiéndose una de cada tres muertes a enfermedades cardiovasculares (Jokinen, 2015).

Diversos estudios han demostrado que el sobrepeso y la obesidad se asocian con un elevado porcentaje de ECV, en comparación con sujetos de peso normal (Burke et al., 2008; Whitlock et al., 2009; Lu et al., 2014). En este sentido, la obesidad es considerada el factor de riesgo más prevalente de ECV en sujetos con enfermedad coronaria establecida (López-Jiménez et al., 2004). En sujetos obesos el riesgo de muerte prematura se duplica y el riesgo de muerte por ECV se quintuplica en comparación con los sujetos no obesos (Poirier et al., 2004). Por el contrario, se han publicado algunos estudios que muestran una menor incidencia de eventos cardiovasculares y una mayor supervivencia en pacientes obesos en presencia de un alto IMC en comparación con los pacientes no obesos. En este sentido, en un estudio realizado en 221934 personas de 17 países diferentes se observó que valores altos de IMC, de la circunferencia de la cintura o del índice cintura-cadera, no conferían ni por si solos ni en combinación un riesgo aumentado para padecer ECV con respecto a los sujetos de peso normal. En este estudio, el riesgo cardiovascular se predijo mejor con los valores de presión sistólica, el historial de diabetes y la dislipemia, y no con los marcadores de obesidad (The Emerging Risk Factors, 2011). Esta controversia entre la presencia de una relación directa o inversa

del IMC con el riesgo de padecer ECV ha sido descrita en la literatura como “controversia de la obesidad”. Las posibles respuestas para tratar de explicar esta controversia han sido que el IMC no distingue la masa grasa (más asociada con los desórdenes metabólicos) de la masa magra, así como la distinta distribución del tejido graso en el organismo entre los diferentes sujetos (Bastien et al., 2014; Ghoorah et al., 2016).

La posible relación entre la obesidad y el aumento en el riesgo cardiovascular es debida, en parte, al impacto de la obesidad sobre la función vascular. En este sentido, la acumulación de grasa produce alteraciones en la estructura y funcionalidad cardiaca (Poirier et al., 2004). Asimismo, el aumento de IMC se ha relacionado con alteraciones en el sistema cardiovascular como, por ejemplo, el aumento de la frecuencia cardiaca, el aumento en la presión arterial, tanto sistólica como diastólica, y el aumento en el volumen sanguíneo. Todos estos cambios afectan a la estructura y masa cardiaca además de provocar una alteración en la vasculatura coronaria (Schunkert, 2002). Además, se ha descrito que los cambios funcionales en los vasos de pequeño calibre pueden favorecer el desarrollo de enfermedad cardiovascular sistémica en pacientes obesos (Bagi et al., 2012).

La fisiopatología de la obesidad y la enfermedad cardiovascular es compleja existiendo diferentes mecanismos por los cuales ambas patologías interactúan (Mandviwala et al., 2016). Además de ser un órgano con gran actividad metabólica, el tejido adiposo produce y secreta una gran variedad de adipoquinas, las cuales pueden actuar tanto a nivel local (órgano autocrino y/o paracrino) como sistémico (órgano endocrino), (Goossens, 2008). Las adipoquinas no solo tienen un papel sobre la inflamación en el tejido adiposo, sino que también ejercen su actividad sobre la función vascular y sus mediadores (Fuster et al., 2016). Por ejemplo, la adiponectina modula la función endotelial, aumentando la producción de óxido nítrico (NO) mediante el aumento de la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Chen et al., 2003). La leptina puede inducir daño a nivel vascular mediado por la estimulación de producción de endotelina-1 y de especies reactivas del oxígeno (ROS), así como de moléculas de adhesión (Cooke & Oka, 2002). Las citoquinas proinflamatorias, como la interleuquina 6

(IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el angiotensinógeno, el factor de crecimiento (TGF β), la leptina o la resistina disminuyen la producción y/o la disponibilidad del NO mediante diferentes fuentes de ROS (Rodríguez-Rodríguez et al., 2009; Sturm et al., 2009) contribuyendo al desarrollo de ECV.

El impacto de la obesidad sobre la función vascular se debe, además de las adipocitoquinas, a diversos factores indirectos. En este sentido, la presencia de grasa visceral en exceso se asocia con un estilo de vida sedentario que a su vez se relaciona con el síndrome metabólico (elevación de la presión sanguínea, hiperglucemia, altas concentraciones de triglicéridos y colesterol de baja densidad y descenso de las concentraciones de colesterol de alta densidad). Todos los componentes del síndrome metabólico son factores de riesgo para el desarrollo de ECV (Jokinen, 2015). Además, es importante resaltar que la obesidad es una de las causas predominantes de patologías como la diabetes mellitus o la hipertensión arterial (García et al., 2013; DeMarco et al., 2014). De hecho, las alteraciones metabólicas, hormonales e inmunológicas que comparten la obesidad y la diabetes pueden contribuir a justificar la relación existente entre ambas patologías (Ferguson et al., 2013; Gutiérrez-Salmerón et al., 2017). En España, en un estudio multicéntrico realizado en 169023 pacientes se observó que la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 en sujetos obesos o con sobrepeso fue del 23,6%. El 17,8% de los pacientes con sobrepeso eran diabéticos y la diabetes mellitus tipo 2 estuvo presente en el 34,8% de sujetos obesos. Además, el 92,6% de los sujetos diabéticos presentaron dislipemia, el 73,7% hipertensión y el 37,8% presentó ECV (Gomis et al., 2014). Además de la hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, también se han descrito otros factores que contribuyen de manera indirecta al desarrollo de ECV como son la inflamación subclínica, la activación neurohormonal con aumento del tono simpático, las altas concentraciones de leptina e insulina, la apnea obstructiva del sueño, el intercambio aumentado de ácidos grasos libres o el depósito de grasa intramiocárdico y subepicárdico (López-Jiménez & Cortes-Bergoderi, 2011). Es decir, la obesidad contribuye al aumento del riesgo cardiovascular, en parte, mediante el desarrollo de comorbilidades asociadas (Bloomgarden, 2002; Poirier et al., 2006; Mandviwala et al., 2016). La reducción de peso es, en muchos casos, un componente crucial de la estrategia terapéutica para mejorar la resistencia a la

insulina, la hipertensión y la hipertrofia ventricular izquierda, entre otros factores de riesgo (Schunkert, 2002).

Otro posible enlace entre la obesidad y la ECV subyace en la presencia de disfunción endotelial. La disfunción endotelial precede en años al daño estructural clínicamente evidente (Vanhoutte, 2009), siendo el primer paso para el desarrollo de la ECV. En este sentido, son numerosos los estudios experimentales realizados en distintos modelos animales de obesidad que indican la presencia de una alteración en la función vascular (Winters et al., 2000; Kearney et al., 2008). Por ejemplo, en un estudio realizado en ratones obesos (alimentados con dieta rica en grasa durante 8 semanas) se demostró que tanto la liberación de NO mediada por la insulina como por la acetilcolina estaba atenuada (Noronha et al., 2005). En humanos, también existen evidencias que muestran un deterioro de la función arterial manifestada por una reducción de las vasodilataciones dependientes de endotelio en arterias coronarias y periféricas en adultos obesos (Meyers & Gokce, 2007). Más aún, se ha demostrado que la pérdida de peso, incluso la moderada, podría revertir el proceso de disfunción endotelial reduciéndose así potencialmente el riesgo cardiovascular (Meyers & Gokce, 2007). En otro estudio en humanos también se confirmó que la pérdida de peso junto con una modificación del estilo de vida mejoraron la función endotelial en pacientes obesos, un efecto debido no sólo a un mejor perfil glucémico, sino también secundario a una reducción de los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios y adipocinas (Taddei et al., 2006).

Obesidad y resistencia a la insulina

La prevalencia de la resistencia a la insulina, paso previo a la diabetes, tiende a aumentar a lo largo de la historia (Ioannou et al., 2007), siendo esta prevalencia aún mayor en población obesa. En un estudio realizado en Estados Unidos se observó que los sujetos adultos con obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) tuvieron una probabilidad 18,4 veces superior de desarrollar resistencia a la insulina que los sujetos no obesos (Kocelak et al., 2012). Estudios realizados en niños y adolescentes también muestran que el porcentaje de

resistentes a la insulina es mayor cuanto mayor es el peso, presentando mayor prevalencia de síndrome metabólico, en especial hiperglucemia e hipertrigliceridemia (Yi et al., 2014).

Aunque de manera general la obesidad se asocia con resistencia a la insulina, en los últimos años se ha observado que existe un subgrupo de individuos obesos que siguen siendo sensibles a la insulina y no desarrollan ECV (Sims, 2001; Reaven, 2003). Así se estima que aproximadamente un 30% de los individuos obesos pertenecen al grupo de los dominados obesos “saludables” (“healthy obesity”, obesidad que no se acompaña de alteraciones cardiometabólicas). Es decir, el mecanismo clave subyacente en los obesos “saludables” podría ser la preservación en la sensibilidad a la insulina. Por tanto, según algunos autores los trastornos cardiovasculares asociados a la obesidad pueden estar en parte mediados por la estrecha relación existente entre obesidad y resistencia a la insulina (Ninomiya et al., 2004; McLaughlin et al., 2007; The Emerging Risk Factors, 2011). Apoyando este concepto, en un estudio realizado en sujetos obesos se observó que además de las alteraciones en la presión sanguínea, y el aumento de la inflamación sistémica, presentaban resistencia a la insulina y un deterioro significativo de la vasodilatación mediada por el flujo en la arteria braquial. La disminución de peso en estos sujetos se relacionó con una mejoría en los niveles de insulina, una potenciación de la vasodilatación y una disminución de la presión arterial (Williams et al., 2005). En un modelo animal de obesidad (ratones con obesidad inducida por la alimentación) se demostró que la liberación de NO mediada tanto por acetilcolina como por insulina estaban atenuadas en comparación con los ratones no obesos (Noronha et al., 2005).

La resistencia a la insulina se define como la incapacidad del organismo para mantener el equilibrio en el metabolismo glucídico mediado por insulina (Reaven, 2011). Los mecanismos de asociación entre obesidad y resistencia a la insulina han sido ampliamente descritos. El tejido adiposo libera a la circulación ácidos grasos libres durante la lipólisis siendo una importante causa de resistencia a la insulina (Snel et al., 2010). Por tanto, la resistencia a la insulina se produce, en parte, por la actuación en cascada de los ácidos grasos no esterificados sobre el receptor de insulina (Tinkov et al.,

2015). Tras el deterioro de la función del receptor de insulina se produce un aumento de la concentración de insulina, que a su vez desencadena un aumento de la liberación de ácidos grasos perpetuando un círculo vicioso (Bruce & Hanson, 2010). Otro de los mecanismos estudiados en la asociación entre la obesidad y resistencia a la insulina es la liberación de citoquinas proinflamatorias. El metabolismo lipídico del tejido adiposo disfuncional conduce a un aumento de los ácidos grasos libres circulantes que inician una cascada de señalización inflamatoria desencadenando la secreción de citoquinas como IL-6, TNF- α e IL-1 β que atraen células del sistema inmune como las células dendríticas, las células T y los macrófagos al tejido adiposo. La infiltración de estas células del sistema inmune en el tejido adiposo produce a su vez mayor secreción de citoquinas provocando una inflamación crónica de bajo grado del tejido adiposo que parece ser una de las causas del desarrollo de la resistencia a insulina asociada a obesidad (Kern et al., 2001; Maachi et al., 2004; McArdle et al., 2013). Un estudio reciente reveló que el consumo de comidas ricas en grasa puede conducir al aumento de los marcadores inflamatorios postprandiales, en particular la IL-6 plasmática en personas con sobrepeso y obesidad (Teng et al., 2014). Por contra, la adiponectina, un factor sensibilizador a insulina, está en niveles reducidos en humanos obesos y resistentes a insulina (Maachi et al., 2004). Una de las más importantes adipocitoquinas el TNF- α , se cree que produce resistencia a la insulina al inducir un defecto en la capacidad de fosforilación de residuos de tirosina en el primer sustrato del receptor de insulina (IRS-1), necesaria para la progresión de la señal intracelular de la hormona (Meshkani & Adeli, 2009). Por otro lado, la resistina favorece la resistencia a la insulina y puede ejercer efectos directos sobre la pared vascular. Recientemente, se ha demostrado que la resistina empeora la vasodilatación mediada por insulina tanto en aorta como en vasos mesentéricos procedentes de ratones (Gentile et al., 2008). Por tanto, la resistencia a la insulina microvascular es un evento temprano en la obesidad donde la inflamación parece jugar un papel fundamental (Zhao et al., 2015; Nandipati et al., 2017). Además de la lipólisis y la inflamación, recientemente ha surgido otra hipótesis que podría contribuir al desarrollo de resistencia a la insulina como es un descenso en la concentración de algunos oligoelementos (cromo, zinc o vanadio) en los adipocitos de sujetos obesos mórbidos (Tinkov et al., 2015). Por tanto, la fisiopatología de la obesidad y la resistencia a la insulina se considera un proceso complejo, donde son

múltiples las vías que pueden contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina en obesos.

Resistencia a la insulina como factor de riesgo cardiovascular

Históricamente, diversos estudios avalan que la resistencia a la insulina es un factor de riesgo para el desarrollo de ECV (Ducimetiere et al., 1980; Després et al., 1996; Laakso & Kuusisto, 2014; Patel et al., 2016; Salazar et al., 2016). La resistencia a la insulina, en cualquier grado de obesidad, acentúa el riesgo de padecer enfermedad coronaria y diabetes tipo 2 (Abbasi et al., 2002). Más aún, existen muchas alteraciones que se han asociado con la resistencia a la insulina y que podrían contribuir a aumentar el riesgo de padecer ECV. Por ejemplo, la elevación de la presión sanguínea, el estado procoagulante, la hiperuricemia, el aumento de la actividad del sistema simpático, el incremento de la reabsorción tubular de sodio o la disfunción endotelial (Reaven, 2011). En este sentido, el enlace entre la resistencia a la insulina y el desarrollo de la ECV podría ser la presencia de disfunción endotelial. De hecho, los sujetos resistentes a la insulina se caracterizan por presentar disfunción endotelial que contribuye a un mayor riesgo de aterosclerosis (Steinberg et al., 1996).

La resistencia a la insulina afecta a tejidos como el hígado, el músculo, o el tejido adiposo, pero además está presente en el endotelio vascular aunque los mecanismos por los que se produce aún no están bien esclarecidos (Kearney et al., 2008). Se ha descrito que la insulina tiene efecto vasodilatador y regula el metabolismo y la homeostasia hemodinámica (Montagnani & Quon, 2000). La insulina, en condiciones fisiológicas, inicia sus efectos biológicos a nivel endotelial estimulando la producción de NO por un mecanismo dependiente de fosfoinositol-3-quinasa (PI-3K). Posteriormente, la PI3K activa la isoforma constitutiva de la eNOS por fosforilación de su residuo Ser1179 mediante un mecanismo independiente de calcio y a través de la activación de la proteína quinasa AKT (Zeng & Quon, 1996; Zeng et al., 2000; Montagnani et al., 2001; Montagnani et al., 2002). Un deterioro en esta vía de transducción de la señal de la

insulina a nivel vascular se ha observado en la obesidad y en la resistencia a la insulina (Kuboki et al., 2000; Jonk et al., 2007). En sujetos obesos se ha descrito la presencia de una reducción de la vasodilatación mediada por insulina (Gentile et al., 2008) y una expresión reducida del receptor de insulina (Goodyear et al., 1995). En ratas obesas con resistencia a la insulina se ha observado una menor activación de eNOS mediada por insulina (Walker et al., 1999).

Diversos estudios en animales obesos indican que la resistencia periférica a la insulina se puede considerar un mediador de la disfunción vascular. En un estudio realizado en ratones obesos resistentes a la insulina se comprobó que la relajación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina (ACh) y no endotelio-dependiente en respuesta a nitroprusiato sódico (NPS) estaba deteriorada respecto al grupo control (Ali et al., 2009). Otro estudio en hámsteres sometidos a una dieta rica en grasa demostró que un aumento del tejido graso en los animales se relacionaba con un mayor grado de resistencia a la insulina y un deterioro de la vasodilatación dependiente de endotelio en respuesta a ACh (Costa et al., 2011), confirmándose, por tanto, la implicación de la resistencia a la insulina asociada a obesidad en el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes.

Estudios en humanos también apoyan la relación entre resistencia a la insulina y disfunción endotelial (Lteif et al., 2005). En un trabajo realizado en sujetos adultos con obesidad mórbida se observó que la función vasodilatadora mediada por el endotelio de la arteria braquial empeoraba a medida que aumentaban los niveles de insulina, el índice Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) y los niveles de triglicéridos (Galvao et al., 2012). Otro estudio en pacientes no diabéticos también confirmó que la resistencia a la insulina limita la relajación dependiente de endotelio en arteria coronaria (Fujii et al., 2008). Otros autores comprobaron que, en sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina sin ECV conocida, fue la resistencia a la insulina (medida mediante el índice HOMA-IR), y no el IMC, el factor determinante en el deterioro de la función vascular en arteria carótida (Lupattelli et al., 2013). Por último, el tratamiento con hipoglucemiantes que produjo un descenso en los niveles de glucosa

y por tanto del índice HOMA-IR en sujetos obesos resistentes a la insulina resultó en una mejoría en la función endotelial medida en arteria braquial (Brame et al., 2004; Vitale et al., 2005).

Por tanto, la alteración en la función endotelial parece jugar un papel primordial en el desarrollo de la ECV y podría ser el enlace que relaciona la obesidad/ resistencia a la insulina/ daño vascular. El mejor conocimiento de los mecanismos subyacentes de la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en sujetos obesos permitirá establecer estrategias farmacológicas dirigidas a intervenir sobre estos mecanismos y por tanto reducir el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

Endotelio vascular

El endotelio vascular está considerado un órgano multifuncional. Además de su papel de barrera selectiva entre la sangre y la pared vascular, el endotelio se caracteriza por su gran capacidad de secreción autocrina y paracrina convirtiéndose en un regulador fundamental del tono vascular (Behringer & Segal, 2012; Puissant et al., 2014). El endotelio desempeña también un papel fundamental en la prevención de formación de trombos en los vasos sanguíneos, permitiendo en condiciones fisiológicas un correcto grado de fluidez sanguínea (Jackson, 2011). Por otro lado, el endotelio participa en la adhesión de leucocitos, eritrocitos y plaquetas a través de selectinas (Telen, 2014), y en la regulación del crecimiento y proliferación de las células musculares lisas vasculares así como en la angiogénesis o formación de nuevos vasos (Stapor et al., 2014). Por último, cabe destacar también la función del endotelio como modulador del proceso inflamatorio e inmunitario (Biedermann, 2001).

Todas estas funciones son posibles gracias a la síntesis y liberación de diferentes sustancias vasoactivas por parte del endotelio. Los principales factores vasodilatadores sintetizados por el endotelio son el NO, la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y los principales factores vasoconstrictores son la endotelina-1, el tromboxano A₂, y la angiotensina II (Cahill & Redmond, 2016). En

condiciones normales el endotelio contribuye a la homeostasis vascular. Por tanto, la integridad del endotelio es esencial para el funcionamiento normal de la pared vascular. Cuando se altera este equilibrio entre los factores vasodilatadores y vasoconstrictores se pueden facilitar patologías como la aterosclerosis u otros desórdenes cardiovasculares (Feletou & Vanhoutte, 2006).

Factores vasodilatadores derivados del endotelio

Como se ha mencionado anteriormente, existen tres componentes fundamentales que intervienen en la relajación endotelial: el NO, la PGI₂ y el EDHF.

Óxido Nítrico (NO)

En 1980 se publicó por primera vez la existencia de un factor endotelial que desempeña un papel fundamental en la vasodilatación vascular al que se denominó factor relajante derivado del endotelio (EDRF o *endothelium-derived relaxing factor*) (Furchgott & Zawadzki, 1980). En 1987 se estableció que el EDRF se correspondía con el NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Como consecuencia en 1998, se otorgó el premio Nobel de Medicina y Fisiología a los científicos Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad por sus descubrimientos en relación con el NO como molécula de señalización fundamental en el sistema cardiovascular.

El NO, es una molécula sintetizada por diversos tipos celulares y juega un papel fundamental en la modulación del tono vascular gracias a su acción vasodilatadora. Además, participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos como la inhibición de la activación de las moléculas de adhesión y de la agregación plaquetaria, interviene en la neurotransmisión central y periférica y frena el crecimiento de las células musculares lisas (Moncada et al., 1991; Moncada & Higgs, 1995; Sagach et al., 2006).

En las células endoteliales, el NO se sintetiza a partir del sustrato L-arginina por acción de la eNOS que produce la oxidación de L-arginina a citrulina liberándose NO (Palmer et al., 1988). El proceso es complejo y requiere de la participación de un agente reductor

como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), un grupo hemo y también de otros cofactores: flavina adenina dinucleótido/mononucleótido (FAD/FMN), y tetrahidrobiopterina (BH₄) (Alderton et al., 2001). Se han identificado tres isoformas dentro de la familia de enzimas NOS:

- La NOS neuronal (nNOS, NOS1) se expresa de forma abundante en las neuronas, pero también se expresa en otros tejidos como el endotelio vascular contribuyendo a la homeostasis vascular (Costa et al., 2016). Además de favorecer la formación de NO, la nNOS participa también en la producción de peróxido de hidrógeno, que en condiciones fisiológicas contribuye también a la vasodilatación (Capettini et al., 2008).
- La NOS endotelial (eNOS, NOS3) se expresa en células endoteliales (Shu et al., 2015) y es la principal responsable de la formación del NO en condiciones fisiológicas.
- La NOS inducible (iNOS, NOS2), contrariamente a las otras dos isoformas, no es dependiente de calcio-calmodulina. Se expresa en situaciones de sepsis e inflamación (Vallance & Chan, 2001; Capettini et al., 2008) y participa en los procesos de daño cardiovascular (Kibbe et al., 1999).

A pesar de que la eNOS y la nNOS son dos isoformas constitutivas, su actividad también depende de otros factores. En primer lugar, existen mecanismos de activación de la NOS independientes de calcio como son la insulina como se ha detallado anteriormente (Shankar et al., 2000) y la fuerza de cizallamiento (shear stress) (Ulker et al., 2011; Ulker et al., 2013). La fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo sobre la pared arterial provoca una reacción en el endotelio produciendo la activación de la proteína quinasa, Akt, que fosforila la eNOS causando su activación y, por tanto, facilitando la formación de NO. Fisiológicamente éste es el estímulo más importante para la activación de la eNOS (Dimmeler et al., 1999). Por último, existe un tercer estímulo calcio y calmodulina dependiente (Piazza et al., 2015) capaz de activar la eNOS o la nNOS y es el mediado por diferentes agonistas como la acetilcolina, serotonina, trombina o bradiquinina (Flavahan, 1992).

Históricamente se ha descrito que la acción vasodilatadora del NO se debe a la activación de la enzima citoplasmática guanilato ciclasa en el músculo liso vascular. La activación de la guanilato ciclasa estimula la conversión del guanosín trifosfato (GTP) a guanosín monofosfato cíclico (GMPc). La acumulación de GMPc en la célula muscular lisa causa la activación de la proteína quinasa G (PKG), iniciando una cascada bioquímica intracelular cuyo resultado final es la disminución de la concentración de calcio citosólico causando la relajación del músculo liso vascular (Holzmann, 1982; Rapoport & Murad, 1983; Palmer et al., 1987; Hill et al., 2010) (**Figura 2**).

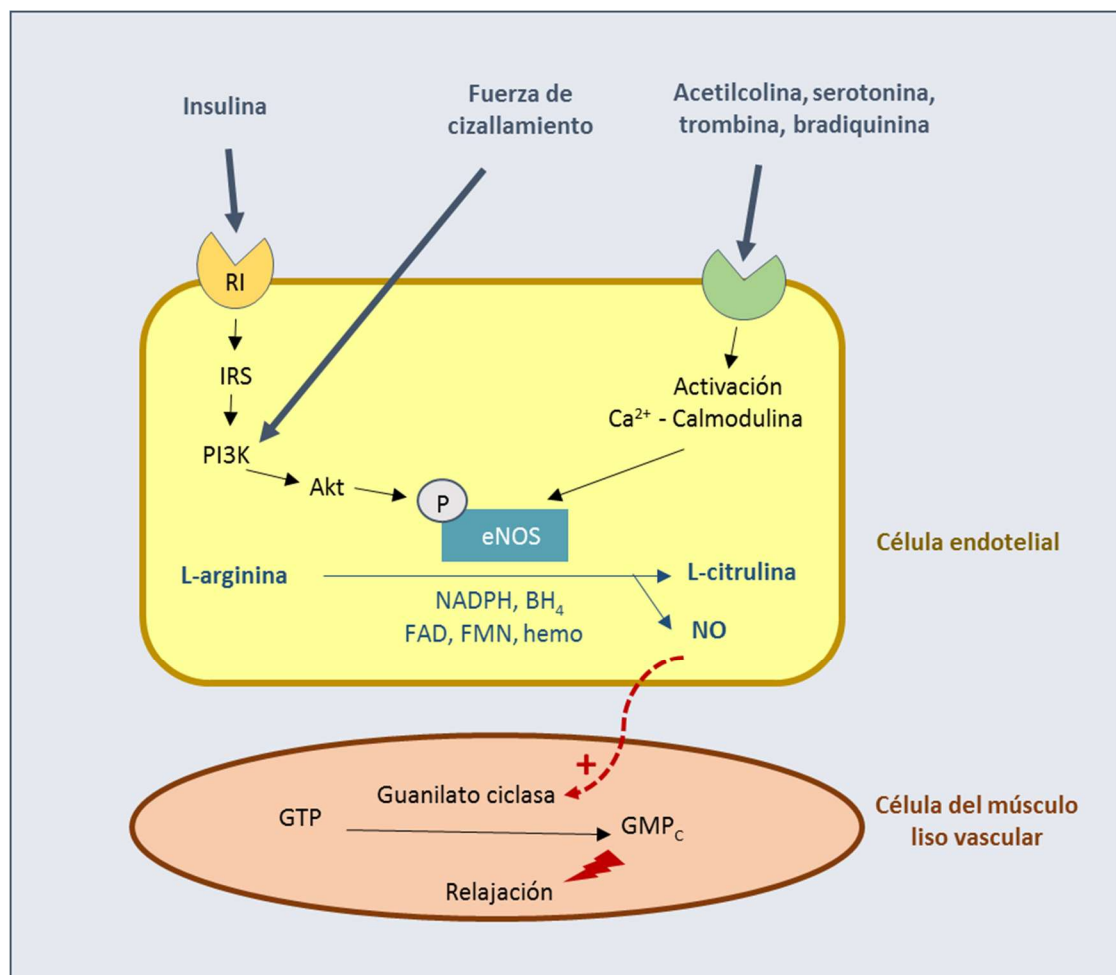


Figura 2. Esquema de la síntesis y difusión del NO. RI, receptor de insulina; IRS, sustrato del receptor de insulina; PI-3-K, fosfoinositol-3-quinasa; P, fósforo; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; Ca²⁺, calcio iónico; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; BH₄, tetrahidrobiopterina; FAD, flavina adenina dinucleótido; FMN, flavina mononucleótido; NO, óxido nítrico; GTP, guanosin trifosfato; GMP_c, guanosin monofosfato cíclico.

Además de la síntesis enzimática del NO, también existe una síntesis endógena por oxidación de nitritos de la dieta que en condiciones de hipoxia o acidemia producen NO (Vitturi & Patel, 2011).

Prostaciclina (PGI₂)

La PGI₂ fue el primer factor derivado del endotelio descrito. Se definió como una sustancia antiagregante capaz de producir relajación del músculo liso vascular (Moncada et al., 1976; Moncada et al., 1977).

La prostaciclina se produce a partir de los fosfolípidos de membrana y mediante la enzima cicloxigenasa (COX). Las fosfolipasas liberan ácido araquidónico que es transformado por la acción de la COX en Prostaglandina H₂ que da lugar a tromboxano, prostaglandinas D, E y F y prostaciclina por la acción de sintasas específicas. La prostaciclina es capaz de estimular receptores específicos en el músculo liso acoplados a proteínas Gs que activan la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la conversión de ATP en adenilato monofosfato cíclico (AMP_c). A su vez, el AMP_c activa la proteína quinasa A que fosforila proteínas que permiten la relajación vascular (Parkington et al., 2004).

Existen evidencias que demuestran que PGI₂ protege contra la aterotrombosis y otras lesiones vasculares, relacionándose la disminución o alteración de PGI₂ con diversas patologías cardiovasculares (Arehart et al., 2007).

Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

Son numerosas las evidencias que indican la existencia de un mecanismo de relajación endotelio-dependiente mediado por un factor independiente del NO y de la PGI₂ y que puede tener lugar como consecuencia de la hiperpolarización de las células del músculo liso vascular (Matsumoto et al., 2017). Este proceso se debe probablemente a un factor que provoca un incremento en la concentración del calcio endotelial, abre los canales de potasio dependientes de calcio y produce hiperpolarización y vasodilatación (Busse et al., 2002). El factor que desencadena la hiperpolarización de la membrana se

denomina de forma genérica factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), y aunque no se ha establecido de forma clara su naturaleza, se han propuesto varios candidatos, como los ácidos epoxyeicosatrienoicos (EETs), metabolitos del ácido araquidónico originados por la actividad de la citocromo P450 oxigenasa, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrógeno (H_2S) entre otros (Feletou & Vanhoutte, 2009).

La importancia del EDHF en la relajación endotelial se ha demostrado en varios vasos sanguíneos de diferentes especies, incluyendo la humana, jugando un papel importante en la fisiología cardiovascular (Luksha et al., 2009). Más aún, la contribución del EDHF a la relajación dependiente de endotelio aumenta conforme el calibre del vaso disminuye (Honing et al., 2000).

Factores vasoconstrictores derivados del endotelio

Endotelina-1

La endotelina-1 se ha descrito como el vasoconstrictor más potente en el sistema cardiovascular humano con una acción notablemente duradera (Davenport et al., 2016). La endotelina-1 favorece la vasoconstricción y la proliferación celular a través de la activación de receptores específicos: los ETA y ETB en las células del músculo liso vascular. Por el contrario, los receptores ETB en las células endoteliales causan vasodilatación a través de la liberación de NO y PGI_2 (Spieker et al., 2001). Aunque en condiciones fisiológicas la endotelina-1 es considerada una proteína ubicua y fundamental en la homeostasis vascular, también se ha visto implicada en varias vías fisiopatológicas asociadas a la disfunción vascular y las enfermedades cardiovasculares (Kaoukis et al., 2013). El NO y la endotelina-1 ejercen funciones antagónicas sobre la función vascular y, por tanto, un desequilibrio entre estos dos mediadores es característico de la disfunción endotelial y es importante en la progresión de la enfermedad vascular (Bourque et al., 2011).

Tromboxano A2

El tromboxano A2 es un metabolito inestable del ácido araquidónico que se produce por la acción de la tromboxano sintetasa sobre la prostaglandina PGH₂, y en un paso previo, por la degradación enzimática del ácido araquidónico por la COX (Dogne et al., 2004). El tromboxano A2 participa en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, incluyendo la agregación plaquetaria y la contracción del músculo liso (Nakahata, 2008). Diversos estudios han revelado la implicación de altos niveles del tromboxano A2 en la disfunción endotelial (Ellinsworth et al., 2014).

Angiotensina II

El sistema renina angiotensina es uno de los principales sistemas que regulan la presión arterial y el tono vascular tanto a nivel sistémico como a nivel tisular (Ilgic & Skrbic, 2014; Miyajima et al., 2015). Uno de sus principales efectores es la Angiotensina II, que es producida por la acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), encargada de convertir la angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II, a través de la estimulación del receptor AT₁, participa en diversas funciones cardiovasculares, metabólicas y de respuesta a los factores de estrés. Por el contrario, la función de los receptores AT₂ no ha sido descrita con claridad, aunque algunos resultados recientes relacionan la activación de los receptores AT₂ con la regulación de la respuesta a los estímulos de estrés (Saavedra & Armando, 2017), proporcionando su regulación una protección endógena a procesos inflamatorios, oxidativos y apoptóticos (Kaschina et al., 2017). La angiotensina II, después de la consiguiente activación de sus receptores, estimula la producción de endotelina-1 y de otros mediadores, tales como el activador de plasminógeno. Muchas de sus acciones están mediadas por mecanismos oxidativos, de los cuales el mejor caracterizado es el generado por la activación de la NADH/NADPH oxidasa, con la consiguiente producción de anión superóxido (Pacher et al., 2007; Nguyen Dinh Cat & Touyz, 2011). La elevación de angiotensina II por encima de los niveles normales aumenta, por tanto, la producción de anión superóxido, promoviendo el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, y jugando un papel fundamental en diversas patologías (Boegehold et al., 2015).

Disfunción endotelial

Como se ha descrito anteriormente, el endotelio vascular contribuye a la homeostasis vascular y, por tanto, cuando se altera su estructura y funciones, se produce disfunción endotelial, considerada el paso previo al desarrollo de la ECV (Davel et al., 2011). Aunque la disfunción endotelial engloba cualquier alteración en las funciones del endotelio, generalmente la mayoría de los estudios experimentales y clínicos restringen el término a la alteración en la regulación del tono vascular, y en particular, a la alteración en la relajación endotelio-dependiente (Hadi et al., 2005).

Diversos estudios experimentales en modelos animales de obesidad y en humanos obesos han demostrado un impacto negativo de la obesidad sobre la función endotelial. Se ha evidenciado una disminución de la vasodilatación mediada por flujo en la arteria braquial de sujetos severamente obesos ($IMC = 42,3 \pm 4,3 \text{ kg/m}^2$), siendo el diámetro de la grasa visceral el factor determinante en la disfunción endotelial asociada a la obesidad (Sturm et al., 2009). En un meta-análisis reciente llevado a cabo utilizando datos de 3 grandes cohortes, se observó un deterioro gradual, desde el peso normal hasta la obesidad, de la función microvascular, determinada por la Tonometría Periférica Arterial (PAT). Esto ocurrió tanto en el grupo de los sujetos metabólicamente saludables, como en el grupo con enfermedad metabólica asociada a obesidad. Por tanto, la obesidad es considerada perjudicial para la salud vascular independientemente del estado metabólico (Brant et al., 2017). Los estudios realizados en modelos animales de obesidad, como ratones obesos (Candela et al., 2017) o ratas obesas (Aghamohammadzadeh et al., 2015), también ponen de manifiesto el deterioro de la función vascular asociado a la obesidad.

Mecanismos implicados en disfunción endotelial asociada a resistencia a la insulina y obesidad

El origen de la disfunción endotelial es multifactorial, habiéndose postulado en su génesis varios mecanismos que se describen a continuación:

Estrés oxidativo

Un *radical* es una molécula que tiene uno o más electrones desapareados en los orbitales moleculares más externos. Generalmente los radicales son moléculas altamente reactivas ya que su electrón *libre* tiende a reaccionar con otras moléculas para estabilizarse (Kehrer & Klotz, 2015). Los radicales libres provienen generalmente de las ROS, que son moléculas intermedias en las reacciones de reducción del oxígeno. Las ROS incluyen radicales libres inestables con un electrón desapareado como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot OH$), peróxido (RO_2^{\cdot}), o alquilo (RO^{\cdot}) y los no radicales libres como H_2O_2 , ácido hipocloroso (HOCl), ozono (O_3), u oxígeno singlete (1O_2). Los oxidantes que contienen nitrógeno, como por ejemplo el NO, se denominan especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Bedard & Krause, 2007).

La cascada de ROS comienza generalmente con la formación del anión superóxido que tiene una vida media muy corta ya que dismuta rápidamente a peróxido de hidrógeno de forma espontánea, y mucho más rápidamente mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD):



El H_2O_2 , a diferencia del anión superóxido, no es un radical libre sino una molécula mucho más estable y un agente oxidante más débil. Sin embargo, en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre, el H_2O_2 puede dar lugar al $\cdot OH$, un radical muy reactivo y tóxico, mediante la reacción química de Fenton (Thannickal & Fanburg, 2000). Otros elementos en la cascada de ROS incluyen la formación de peroxinitrito a partir del anión superóxido y del NO. El peroxinitrito puede nitrar residuos tirosina de determinadas proteínas, impidiendo las interacciones funcionales de las mismas, comprometiendo la viabilidad celular (Pacher et al., 2007).

A concentraciones moderadas, las ROS desempeñan un papel fisiológico importante como moléculas de señalización con funciones reguladores que modulan los cambios en

la homeostasis celular y tisular (Droge, 2002). Sin embargo, el aumento excesivo y/o sostenido en la producción de ROS tiene como consecuencia un aumento de la proliferación e hipertrofia celular, de la fibrosis, de la migración celular, de la angiogénesis y de la inflamación (Ogita & Liao, 2004). Todos estos procesos están implicados en la patogénesis de numerosas enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus, y la aterosclerosis (Droge, 2002).

En condiciones normales, las células mantienen un estado de equilibrio redox entre la producción de las ROS y RNS y su desaparición, mediante sistemas enzimáticos (SOD, hemo oxigenasa, catalasa, paraoxonasa o glutatión peroxidasa) y no enzimáticos (vitamina C, vitamina E, etc.) (Li et al., 2013). Sin embargo, en determinadas situaciones este equilibrio se rompe, ya sea por un exceso de producción de pro-oxidantes, una deficiencia de los sistemas antioxidantes, o por una conjunción de ambas circunstancias generando un estado de estrés oxidativo que, en mayor o menor grado, puede llegar a producir lesiones celulares reversibles o irreversibles (Forstermann, 2008). Algunos autores han descrito que la alteración del estado antioxidante en roedores puede alterar significativamente el desarrollo de resistencia a la insulina o diabetes (Styskal et al., 2012).

Contribución del estrés oxidativo a la disfunción endotelial

El estrés oxidativo daña el sistema vascular de forma directa reduciendo la producción del NO y disminuyendo, por tanto, su capacidad vasoprotectora (Higashi et al., 2009; Schramm et al., 2012). Diversos estudios avalan que la formación de ROS, y en especial el anión superóxido, es el mecanismo aislado más importante para el deterioro de la función vascular (Montezano & Touyz, 2012). Su implicación en la génesis del daño vascular se ha descrito en múltiples patologías como la diabetes mellitus, la resistencia a la insulina y la obesidad (Matsuda & Shimomura, 2014). En este sentido, se ha descrito que la obesidad per se puede inducir estrés oxidativo sistémico a través de diversos mecanismos como la generación de superóxido a partir de la NADPH oxidasa, la fosforilación oxidativa, y la activación de la proteína quinasa C, entre otros. Además, existen otros factores que pueden inducir el estrés oxidativo asociado a la obesidad

como la disminución de la defensa antioxidante, y la inflamación crónica (Manna & Jain, 2015). Más aún, parece ser que el estrés oxidativo es un factor crucial en la patogénesis de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad (Das et al., 2016).

La implicación del estrés oxidativo en el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes observadas en la resistencia a la insulina y obesidad se ha evaluado utilizando distintos barredores de radicales libres. En este sentido, ratones obesos (Kobayasi et al., 2010) y sujetos obesos mórbidos (Viridis et al., 2011) muestran una mejoría en las relajaciones endotelio-dependiente después del tratamiento con SOD, o con el mimético de la SOD, TEMPOL, que actúan como barredores de superóxido (Bertera et al., 2014).

Existen diferentes fuentes de estrés oxidativo que contribuyen al deterioro de la función vascular como se describe a continuación:

Fuentes de estrés oxidativo

Xantina oxidasa

La xantina oxidoreductasa es una enzima que se localiza fundamentalmente en las células vasculares y especialmente en las células endoteliales (Bailey et al., 1988; Vickers et al., 1998). Esta enzima posee dos formas intercambiables: la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa capaces de catalizar la reacción de oxidación de la hipoxantina y la xantina en el metabolismo de las purinas. La xantina deshidrogenasa utiliza como cofactor en la reacción el NAD^+ formándose NADH . La xantina oxidasa, a diferencia de la anterior, utiliza como cofactor el oxígeno generándose como resultado anión superóxido y H_2O_2 (Cai & Harrison, 2000).

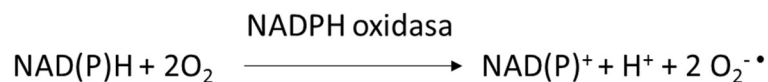
Se ha descrito ampliamente la implicación de la xantina oxidasa como fuente de anión superóxido en la disfunción endotelial (Berry & Hare, 2004). Varios estudios en pacientes con ECV conocida o con factores de riesgo para desarrollarla, revelaron una mejoría de la función endotelial y de los marcadores circulantes de estrés oxidativo tras la inhibición

de la xantina oxidasa (Doehner & Anker, 2005; Higgins et al., 2012). En un modelo animal de resistencia a la insulina (ratas tratadas con fructosa en agua de bebida y dieta rica en grasa y sal durante doce semanas) la administración del inhibidor de la xantina oxidasa, alopurinol, después del establecimiento de la resistencia a la insulina y durante el desarrollo de complicaciones vasculares, produjo una mejoría en la función vascular (El-Bassossy & Watson, 2015). Más aún, un aumento de la actividad de la xantina oxidasa se ha observado en humanos con obesidad. En estos sujetos, la reducción de peso se asoció con un descenso significativo en la actividad de la xantina oxidasa (Richette et al., 2016).

NADPH oxidasa

Numerosos estudios sugieren que la NADPH oxidasa es la fuente más importante de anión superóxido en las células vasculares (Maghzal et al., 2012; Chang et al., 2017).

La familia de las NADPH oxidasas, también conocida como NOX/DUOX, es un conjunto de enzimas que transfieren los electrones a través de las membranas biológicas reduciendo el oxígeno a anión superóxido como se muestra en la siguiente reacción (Bedard & Krause, 2007):



La familia NOX se compone de siete homólogos catalíticos: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2 (Gianni et al., 2011) que se diferencian en los mecanismos que los regulan, en su localización tisular y en los productos ROS que generan (Teixeira et al., 2016). Las subunidades NOX1, NOX2, y NOX5, se expresan en el endotelio vascular, y sus actividades se asocian con daño endotelial. Más aún, la subunidad NOX4, considerada la isoforma más abundante a nivel endotelial (Ago et al., 2004), aunque se asocia con daño endotelial existe evidencia que indica que puede ejercer una acción protectora sobre el endotelio vascular (Montezano & Touyz, 2012).

La activación de la NADH/NADPH oxidasa, con el consecuente incremento de la formación de ROS vascular, puede producirse por la acción de diferentes estímulos tales

como: la angiotensina II, la trombina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y el TNF- α (Cai & Harrison, 2000). La formación de ROS mediada por la NADPH oxidasa participa en la patogénesis de la disfunción endotelial asociada a situaciones patológicas en las cuales se ha descrito un aumento de la actividad enzimática de la NADPH, como las enfermedades cardiovasculares (Lambeth et al., 2008), la resistencia a la insulina y la obesidad. En este sentido, se ha demostrado que las ROS derivados de NOX4 pueden jugar un papel en el inicio de la resistencia a la insulina y la inflamación del tejido adiposo. Por tanto, las intervenciones farmacológicas dirigidas a disminuir la producción de ROS mediado por NOX4 podría representar una estrategia en la prevención de la resistencia a la insulina, frecuentemente asociada a la obesidad (Den Hartigh et al., 2017). En línea con lo anterior, recientemente se ha descrito la eficacia de una molécula inhibidora de la NOX2, la 3-benzil-7-(2-benzoxazolil)tio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidina, también denominada VAS2870 (Sun et al., 2012), capaz disminuir la formación de las ROS a nivel vascular (Schramm et al., 2012; Nikiforova et al., 2013). En concreto, la adición aguda del VAS 2870 produjo una mejoría de la relajación endotelial en arterias mesentéricas de ratas resistentes a la insulina (El Assar et al., 2015a).

Cadena de transporte mitocondrial

Las mitocondrias son esenciales para el mantenimiento de la función fisiológica normal de las células, controlando la supervivencia o la muerte celular y la adaptación a los cambios en el entorno metabólico. La mitocondria juega, por tanto, un papel fundamental en la vida celular y es considerada la principal responsable de la obtención de energía, en forma de ATP. Además, la mitocondria produce a lo largo de su vida grandes cantidades de anión superóxido y H₂O₂ que pueden generar a su vez otros radicales libres (Kukat & Trifunovic, 2009). Por tanto, las modificaciones de la dinámica mitocondrial en los órganos implicados en el metabolismo energético como el páncreas, el hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco podrían ser de gran relevancia en el desarrollo de la resistencia a la insulina, la obesidad y la diabetes tipo 2 (Lahera et al., 2017).

La mitocondria junto con la NADPH oxidasa son consideradas las principales fuentes de estrés oxidativo que participan en la en la génesis de la disfunción endotelial (Szewczyk et al., 2015). Ambas fuentes están relacionada entre sí, de hecho la NOX4 es considerada una fuente mitocondrial de estrés oxidativo, acelerando la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y favoreciendo la producción de ROS (Touyz & Montezano, 2012). Para contrarrestar el estrés oxidativo, la mitocondria posee mecanismos de detoxificación como la SOD, la glutatión peroxidasa, la catalasa, etc., que neutralizan el anión superóxido y los peróxidos formados para prevenir el daño celular (Kluge et al., 2013). Cuando se produce un desequilibrio entre los factores antioxidantes y oxidantes mitocondriales en favor de éstos últimos se produce un aumento de superóxido que reacciona con el NO, causando una marcada reducción de la actividad biológica del mismo, para formar el peroxinitrito, que constituye otro factor de daño mitocondrial. El estado oxidativo mitocondrial se mantiene a través de mecanismos de retroalimentación positiva (Pacher et al., 2007) perpetuando así un círculo vicioso (Li et al., 2013) favoreciendo el desarrollo de la disfunción endotelial, lo que desencadena complicaciones cardiovasculares (Higashi et al., 2014). Por tanto, la reducción del estrés oxidativo de origen mitocondrial podría tener un impacto positivo sobre la función endotelial. En este sentido, la infusión *in vivo* del barredor de anión superóxido mitocondrial, mitoTEMPO, en ratones hipertensos provocó una disminución en la producción vascular de anión superóxido y un aumento de la producción de NO y, como consecuencia, un aumento de la relajación endotelial (Dikalova et al., 2010). En otros estudios realizados en ratas resistentes a la insulina también se ha comprobado la eficacia del mitoTEMPO en la reducción del estrés oxidativo mitocondrial (Pung et al., 2012; Jeong et al., 2016).

Desacoplamiento de la NOS

Además de la producción del NO, la NOS puede generar anión superóxido y ser una fuente de estrés oxidativo. Esta situación, conocida como desacoplamiento de la NOS, ocurre cuando se produce un déficit de cofactor (BH₄), o del sustrato (L-arginina) como se detallará más adelante (Luo et al., 2014). Esta situación da lugar a disfunción endotelial no solo por una disminución en la producción de NO, sino también por un

aumento de generación de anión superóxido y por la formación de peroxinitrito, derivado de la reacción de los compuestos anteriores (Moens & Kass, 2006).

El BH_4 es un cofactor fundamental para la correcta actividad de la eNOS (Lam et al., 2006). La unión de BH_4 a la eNOS favorece un cambio de conformación de la enzima que aumenta su afinidad por el sustrato y permite conseguir un flujo adecuado de electrones que oxidan la L-arginina (Liu & Gross, 1996). El efecto final es una mayor producción de NO, y por ende una mayor relajación endotelio-dependiente. Por tanto, la deficiencia del cofactor va a tener un impacto negativo sobre la función endotelial. En este sentido, diversos estudios en modelos animales de resistencia a la insulina han demostrado la contribución de los bajos niveles de BH_4 a la disfunción endotelial mediante la reducción de NO y la generación del anión superóxido (Shinozaki et al., 1999). En un estudio realizado en ratas alimentadas con fructosa, la administración oral de BH_4 , resultó en una potenciación de la relajación endotelio-dependiente en los segmentos aórticos. Además, el tratamiento con BH_4 se asoció con un aumento notable en la actividad de la eNOS, así como una reducción del 70% en la producción de anión superóxido (Shinozaki et al., 2000). Recientemente, se ha observado un deterioro de las vasodilataciones en arterias mesentéricas de ratones con delección del gen codificante para la enzima responsable de la síntesis de BH_4 en comparación con ratones de tipo salvaje. El empeoramiento de la relajación mediada por NO se asoció con un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno derivado de la eNOS. Este estudio sugiere que la biosíntesis de BH_4 puede proporcionar un nuevo objetivo terapéutico para la prevención y el tratamiento de la disfunción microvascular en sujetos con enfermedad cardiovascular (Chuaiphichai et al., 2017).

Las causas de la deficiencia de BH_4 aún están por determinar, aunque la susceptibilidad a oxidarse en condiciones de estrés oxidativo y de señales redox podría ser uno de ellos. De hecho, la biodisponibilidad de BH_4 depende de su síntesis y reciclaje que aumentan sus niveles, así como del estrés oxidativo que los reduce (Bendall et al., 2014). Varios estudios han demostrado que el peroxinitrito formado durante el estrés oxidativo puede oxidar el BH_4 transformándolo en BH_3 y BH_2 consecutivamente (Milstien & Katusic,

1999). Esta reducción de los niveles de BH_4 parece ser determinante en el desacoplamiento de la eNOS (Bendall et al., 2005).

Alteración de la vía del óxido nítrico

Como se ha descrito anteriormente, el NO desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la función, estructura e integridad vascular (Su, 2015). En la disfunción endotelial se produce un descenso de la biodisponibilidad de NO, bien por disminución de su síntesis o por aumento de su degradación. La alteración de la relajación dependiente del endotelio debido a la disminución de la síntesis y/o de la biodisponibilidad del NO constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de la disfunción endotelial (O'Connell & Genest, 2001).

La disminución de la síntesis del NO puede ser debida a diversos mecanismos. Por un lado, el peroxinitrito derivado de la reacción entre el NO y el radical superóxido, es capaz de alterar la función de una variedad de enzimas celulares (Beckman & Koppenol, 1996). En particular, el peroxinitrito puede alterar la actividad catalítica de la eNOS en células endoteliales y como resultado reduce la producción de NO. Más aún, el efecto deletéreo del peroxinitrito no solo se limita al endotelio vascular si no también afecta a la guanililciclase en las células del músculo liso vascular y, por ende, a la capacidad de respuesta de los tejidos diana al NO (Munzel et al., 2005). Por otro lado, los niveles elevados de lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada también inhiben la actividad de la eNOS y como consecuencia, se produce una disminución de la producción de NO (Blair et al., 1999; Feron et al., 2001). Más aún, varios estudios han demostrado que el $TNF-\alpha$, implicado en la etiología de la resistencia a la insulina, y cuyos niveles están aumentados en obesidad, disminuye también la expresión de la eNOS al disminuir la estabilidad del ARNm que codifica para la enzima (Sansbury & Hill, 2014).

Existen varios mecanismos que pueden condicionar la biodisponibilidad del NO en el contexto de la obesidad y resistencia a la insulina. Entre estos se han propuesto: la disminución en la biodisponibilidad del sustrato de la eNOS (L-arginina), la disminución en los niveles del cofactor (BH_4), el aumento de la actividad de la arginasa (enzima que

degrada la L-arginina) y el aumento del inhibidor endógeno de la NOS (ADMA) (Figura 3).

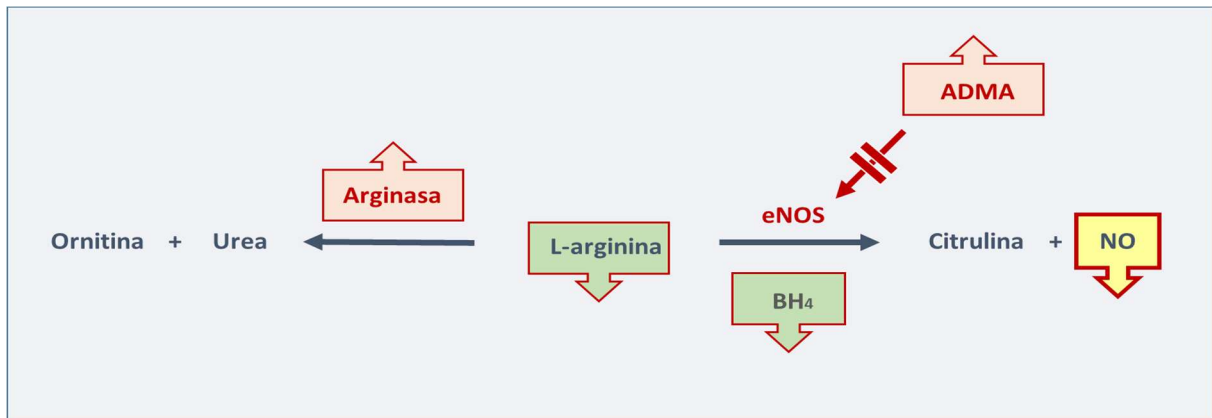


Figura 3. Esquema abreviado de diferentes mecanismos que pueden producir la disminución de NO

Disminución de la biodisponibilidad de L-arginina

La arginina es un aminoácido no esencial en condiciones fisiológicas, ya que el organismo es capaz de sintetizarlo de forma endógena. Sin embargo, en dietas deficientes o en presencia de ciertas enfermedades la síntesis endógena puede ser insuficiente siendo necesario un aporte exógeno (Ball et al., 2007). La L-arginina ejerce múltiples funciones: actúa como antioxidante, incrementa la relajación de las células del músculo liso, inhibe la expresión de moléculas de adhesión, actúa como antiapoptótico, inhibe la agregación plaquetaria y disminuye la expresión de la endotelina-1 (Tousoulis et al., 2007). Además de ser el sustrato de las NOS, la L-arginina interviene en diversas reacciones enzimáticas. En este sentido, la L-arginina puede ser sustrato para la arginasa, responsable de metabolizar la arginina en ornitina y urea (Morris, 2002).

Una disminución de la biodisponibilidad de L-arginina se ha relacionado con un aumento de la mortalidad y del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Tang et al., 2009). Estudios realizados en animales (conejos tratados con dieta rica en colesterol) demuestran que el tratamiento con L-arginina no solo preserva la función vasodilatadora dependiente de endotelio (Boger et al., 1997) sino que también ejerce una función antiaterogénica (Wang et al., 1994). Aunque los resultados de la

suplementación oral de L-arginina en animales hipercolesterolémicos han mostrado generalmente efectos beneficiosos en cuanto a la función vascular, los datos en seres humanos son variables, posiblemente debido al pequeño tamaño muestral y a los breves períodos de estudio (Preli et al., 2002). Mientras que Tousoulis y cols. (2007) muestran una mejoría en la función endotelial en arterias coronarias tras la infusión de L-arginina (Tousoulis et al., 2007), en otro estudio realizado en pacientes tratados con L-arginina, por vía oral, durante seis meses post-infarto se observó que la L-arginina no mejoraba la rigidez vascular y además se asociaba a una mayor mortalidad (Schulman et al., 2006). En un modelo animal de resistencia a la insulina (ratas sometidas a dieta rica en grasa) se demostró que la suplementación con L-arginina en la dieta previno la disminución en la capacidad antioxidante total y evitó el aumento del índice HOMA-IR, mejorando los marcadores de disfunción endotelial (Bogdanski et al., 2015). En humanos obesos también se ha confirmado que la suplementación con L-arginina disminuye la resistencia a la insulina (Bogdanski et al., 2012).

Teóricamente la hipótesis de disminución del sustrato es difícil de sostener puesto que la concentración plasmática de arginina en sujetos sanos y con enfermedad cardiovascular oscila entre 40 y 100 μM (Böger & Bode-Böger, 2001), con una constante de Michaelis-Menten para la eNOS de 3 μM , aproximadamente. Es decir, la concentración de L-arginina es más que suficiente para saturar la eNOS y conseguir su máxima actividad (Pollock et al., 1991). Por tanto, una adición exógena de L-arginina no debería suponer mayor producción de NO. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los resultados en este sentido son contradictorios. A esta contradicción se le denomina “paradoja de la L-arginina”. Se han postulado varias hipótesis para intentar explicar esta paradoja. Algunos autores hacen referencia a un aumento de la actividad de la arginasa lo que conduciría a una disminución de L-arginina disponible para eNOS y la consiguiente caída de la síntesis de NO (Durante et al., 2007). Otros autores hacen alusión a que la arginina se encuentra en compartimentos difícilmente intercambiables entre sí. Por tanto, aunque exista suficiente concentración de L-arginina no estaría accesible a la enzima y al infundir L-arginina al citosol esta situación mejoraría (Elms et al., 2013). Por último, otra de las teorías posibles para explicar la paradoja es el aumento de las concentraciones de ADMA, inhibidor competitivo de la eNOS. En

pacientes con concentraciones elevadas de ADMA la adición de L-arginina mejoraba la relajación endotelial (Boger, 2004). Aunque son muchas las teorías propuestas, son necesarios más estudios de investigación para esclarecer los mecanismos de acción de la L-arginina.

Aumento de la arginasa

La arginasa es una enzima que compite con la eNOS por el mismo sustrato, la L-arginina, hidrolizándolo en ornitina y urea (Vanhoutte, 2008). Como consecuencia, disminuye la producción de NO, lo que resulta en un empeoramiento de la relajación endotelial (Durante et al., 2007) (**Figura 4**). La arginasa es un homotrímero de 20 a 40 kDa que presenta dos isoformas: la arginasa-1 (arginasa hepática) y la arginasa-2 (arginasa extrahepática) siendo la afinidad por la L-arginina mayor en la arginasa-1 que en la arginasa-2. Ambas isoenzimas existen en la mayoría de tejidos y su expresión depende del estado funcional y los requerimientos metabólicos en cada momento (Mielczarek-Putra et al., 2008). Diversos autores han descrito que la sobreexpresión de la arginasa-1 o de la arginasa-2 en las células endoteliales produce una disminución de la síntesis de NO (Li et al., 2001; Li et al., 2002). Se ha sugerido que la inhibición de la arginasa incrementa la biodisponibilidad del NO, reduce el estrés oxidativo, mejora la función vascular y tiene un papel protector frente al daño isquémico (Pernow & Jung, 2013). Otro de los mecanismos que relacionan la arginasa con la disfunción endotelial es el aumento de la concentración de ornitina, que contribuye al incremento de lesiones vasculares (Durante et al., 2007). En este sentido, la inhibición de la arginasa se considera una prometedora diana terapéutica que podría ser útil en el tratamiento de la aterosclerosis (Ryoo et al., 2008), la diabetes mellitus (Ryoo et al., 2008; Ming et al., 2012) y con capacidad para revertir el daño endotelial y prevenir la enfermedad cardiovascular (Durante et al., 2007). De hecho, se ha observado un aumento en la expresión de arginasa en aorta de ratones obesos que se relacionó con el desacoplamiento de la NOS y, por tanto, con el deterioro en la relajación dependiente del endotelio (Yu et al., 2014).

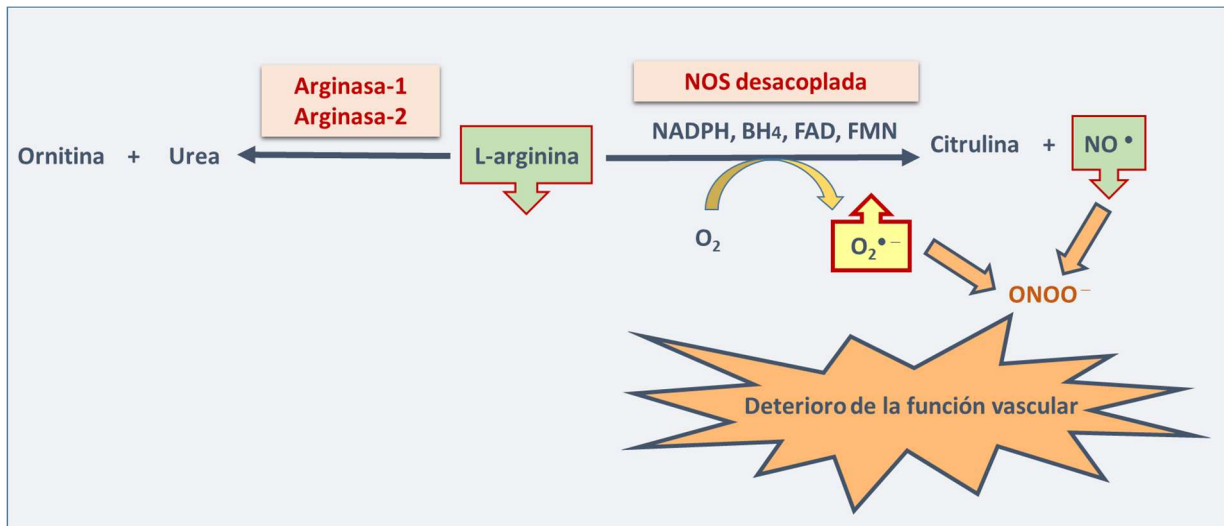


Figura 4. Esquema de la actuación de la arginasa en el deterioro de la función vascular mediante aumento de anión superóxido y disminución de L-arginina y de NO.

En línea con lo anterior, El-Bassossy y cols. (2013) evidenciaron un aumento en la actividad sérica de la arginasa en ratas resistentes a la insulina tratadas con fructosa en agua de bebida. La inhibición de la arginasa revertió el deterioro de la función endotelial en aorta y disminuyó la resistencia a la insulina (El-Bassossy et al., 2013).

Más aún, se ha demostrado que el inhibidor de la arginasa, nor-NOHA, puede mejorar la función endotelial deteriorada en modelos de obesidad y resistencia a la insulina (Huynh et al., 2009; Havlinova et al., 2013; Chung et al., 2014). Este hecho podría constituir una posible explicación para la reducción de la disponibilidad de L-arginina en situaciones de resistencia a la insulina y obesidad, ya que un aumento de la actividad arginasa, limitaría la disponibilidad del sustrato para la síntesis de NO.

Aumento del ADMA

Además de la disponibilidad de L-arginina, la biodisponibilidad de cofactores o la activación de la NOS, la presencia de un análogo de L-arginina que actúa como inhibidor endógeno de la NOS, la dimetilarginina asimétrica (ADMA), también contribuye a la regulación de la producción de NO. El ADMA compite con el sustrato de la eNOS desplazándolo de su sitio de unión, por lo que disminuye la conversión de L-arginina a NO y citrulina (Vallance et al., 1992a). Por tanto, la adición exógena de L-arginina

desplazaría al ADMA y mejoraría la relajación endotelio dependiente, por aumento de la formación de NO, lo que supone una posible explicación a la paradoja de la L-arginina (Das et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado la asociación del ADMA con diversos procesos patológicos como la hipertensión, la diabetes mellitus y la resistencia a la insulina (Stuhlinger et al., 2002; Das et al., 2011). Más aún, altos niveles de ADMA se consideran como un marcador temprano de disfunción endotelial y de resistencia a insulina en pacientes con hipertensión y diabetes tipo 2 (Das et al., 2011). Un estudio reciente mostró una correlación positiva entre los niveles séricos de ADMA y la gravedad de la enfermedad en pacientes con enfermedad cardiovascular. De hecho, los cambios en los niveles de ADMA en sangre pueden inducir infarto agudo de miocardio, así como la aparición de complicaciones asociadas a la enfermedad cardiovascular (Bouras et al., 2013; Wang et al., 2017). Además, en los últimos años se ha propuesto el ADMA como un factor de riesgo fuerte e independiente para la mortalidad en sujetos con enfermedad grave (Nijveldt et al., 2003).

La mayor parte del ADMA es degradado mediante la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH). En humanos se generan aproximadamente 300 μ moles al día de ADMA, de los cuales aproximadamente 250 μ moles son degradados por la DDAH en el interior del organismo en condiciones normales (Achan et al., 2003). Por tanto, la presencia de altos niveles de ADMA es generalmente el resultado de un empeoramiento de la enzima DDAH. Se han descrito dos isoformas de la enzima DDAH (la DDAH1 y la DDAH2), que tienen una actividad enzimática parecida, pero con distinta distribución vascular (Leiper et al., 1999; Tran et al., 2000). Se ha detectado una elevada expresión de la DDAH1 en el endotelio vascular (Hu et al., 2009), siendo la principal responsable de la degradación del ADMA en el endotelio.

Diferentes modelos preclínicos han evaluado el papel de la DDAH en las complicaciones cardiovasculares incluyendo la diabetes y la resistencia a la insulina (Lai & Ghebremariam, 2016). Por ejemplo, en un modelo animal de diabetes inducida por dieta

alta en grasa, el ADMA procedente de la grasa visceral jugaba un papel en la regulación de la sensibilidad de la insulina a través de la modulación de genes claves en la vía de señalización de insulina como son el IRS-1 y el transportador de glucosa 4 (GLUT-4) (Zheng et al., 2013). Otros estudios en sujetos y en animales resistentes a la insulina han evidenciado niveles disminuidos de DDAH1 y niveles aumentados de ADMA, que se relacionaron con la disfunción endotelial y el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (Toutouzas et al., 2008; Chen et al., 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Todas las consideraciones mencionadas hasta ahora permiten postular la siguiente hipótesis:

- La presencia de resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos es la que provoca un deterioro de la función vascular, manifestada inicialmente por disfunción endotelial, lo que justificaría la diferencia en el riesgo de enfermedad cardiovascular en comparación con los pacientes obesos que no presentan resistencia a la insulina. Un incremento del estrés oxidativo y/o una alteración en la vía de L-arginina/NO contribuirían al deterioro de la función endotelial asociada a la resistencia a la insulina. El tratamiento farmacológico que aumentara la síntesis o biodisponibilidad del óxido nítrico serviría para aliviar/paliar el daño endotelial presente tanto en humanos resistentes a la insulina como en un modelo animal de resistencia a la insulina.

Objetivos generales

- Determinar el papel de la resistencia a la insulina en la disfunción endotelial de humanos obesos mórbidos y de un modelo animal de resistencia a la insulina sin obesidad.
- Evaluar los posibles mecanismos implicados en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina, particularmente los relacionados con el estrés oxidativo y la alteración de la vía de L-arginina/ óxido nítrico.

Objetivos específicos

- Evaluar el impacto de la resistencia a la insulina sobre las relajaciones endotelio-dependientes en sujetos obesos mórbidos y en un modelo de rata resistente a la insulina, no obesa.
- Determinar la implicación del estrés oxidativo en el deterioro de la relajación endotelio-dependiente en humanos y ratas.
- Analizar la producción del anión superóxido en microvasos de grasa visceral de humanos y su relación con la disfunción endotelial.
- Evaluar el papel de los diferentes sistemas generadores de estrés oxidativo vascular (mitocondria, NADPH oxidasa y desacoplamiento de la NOS) en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en humanos y en ratas.
- Evaluar la influencia de la resistencia a la insulina sobre el contenido del inhibidor endógeno de la NOS, la dimetilarginina asimétrica (ADMA) así como la expresión del enzima encargado de su metabolismo: la DDAH, tanto en humanos como en ratas.
- Evaluar las posibles alteraciones en la vía de L-arginina/NO (disminución del sustrato de la eNOS y aumento en la expresión de arginasa), así como el efecto de tratamientos que aumenten la síntesis del NO sobre el deterioro de las relajaciones endotelio-dependiente asociado a la resistencia a la insulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Muestras de sujetos

Todos los estudios de experimentación en humanos fueron aprobados por el Comité Ético, así como por el Comité de Investigación del Hospital Universitario de Getafe. Se obtuvieron consentimientos informados de todos los participantes en el estudio.

Criterios de inclusión

El estudio fue realizado en 41 sujetos obesos mórbidos ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) de edades comprendidas entre 26 y 65 años. Se dividieron los sujetos en dos grupos de acuerdo al índice HOMA-IR: 1- Sujetos obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI; $\text{HOMA-IR} < 3,8$); y 2- sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI; $\text{HOMA-IR} \geq 3,8$). El punto de corte para el índice HOMA-IR fue definido previamente para la población española correspondiente al percentil 90 en adultos no diabéticos (Ascaso et al., 2001).

Se incluyeron en el estudio aquellos sujetos obesos mórbidos que presentaban factores de riesgo cardiovascular como la diabetes, hipertensión, dislipemia y tabaquismo. Por otro lado, se estudiaron 5 sujetos sanos no obesos (grupo control) con IMC : 20-29 kg/m^2 .

Criterios de exclusión

Para la selección de OM-RI y OM-NRI se excluyeron del estudio todos los sujetos con clínica o antecedentes evidentes de enfermedad cardiovascular como fallo cardiaco congestivo, enfermedad isquémica cardiaca o enfermedad cerebrovascular. Del mismo modo se excluyeron los sujetos con enfermedad hepática, enfermedad renal, embarazo, en uso de corticosteroides cuatro semanas antes de la cirugía bariátrica y cualquier causa de malabsorción o desnutrición como por ejemplo la enfermedad de Crohn, celiaquía, etc.

Para la selección de sujetos pertenecientes al grupo control, además de aplicar los criterios de exclusión arriba mencionados se excluyeron aquellos que presentaban circunstancias con impacto conocido sobre la función endotelial como: hipertensión ($\geq 140/90$ mm Hg), diabetes, tabaquismo activo, valores de colesterol total superiores a 200 mg/dl o IMC ≥ 30 Kg/m².

Obtención de muestras

Tras un ayuno nocturno de 12 horas, se realizó la extracción de sangre a todos los sujetos por venopunción y se depositó en tubos con gel separador para la obtención de suero y tubos anticoagulados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para la obtención de plasma.

El suero y el plasma se separaron por centrifugación refrigerada a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante diez minutos y se alicuotaron en criotubos para su congelación a -80 °C. Se conservaron las muestras a esta temperatura para realizar las determinaciones de glucosa, insulina, arginina y ADMA de todos los sujetos de forma conjunta. Los tubos restantes se enviaron al laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Getafe donde fueron centrifugados a 3500 rpm durante diez minutos a temperatura ambiente para la determinación en los autoanalizadores de los diferentes parámetros bioquímicos que se detallan más adelante.

La grasa visceral de los pacientes obesos mórbidos se obtuvo mediante cirugía bariátrica no urgente en condiciones de asepsia en el Hospital Universitario de Getafe por las técnicas de Roux-en-Y bypass gástrico, gastrectomía en manga vertical y banda gástrica ajustable. En el caso del grupo control se obtuvieron las muestras de grasa visceral por técnicas de laparoscopia en el Hospital Universitario de Getafe (reparación de hernia hiato, acalasia y colecistectomía).

Muestras de animales de experimentación

Los estudios de experimentación en animales se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki y con la legislación vigente sobre el Uso de Animales de Experimentación (RD-53/2013). Además, todos los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Universitario de Getafe.

Para realizar la presente tesis se seleccionaron 30 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley procedentes de los laboratorios Harlan de Barcelona. Las ratas tuvieron acceso libre a la comida y al agua y fueron sometidas a ciclos de 12h luz/oscuridad. Las ratas se dividieron en dos grupos: ratas control (RC) y ratas resistentes a la insulina (RRI), como se describe a continuación:

Modelo de resistencia a la insulina

Para obtener el modelo de resistencia a la insulina se trataron las ratas de 4-5 semanas de edad con fructosa disuelta en agua de bebida al 20%. Los experimentos se iniciaron a partir de la octava semana de la administración de fructosa. Se ha demostrado previamente que este periodo de exposición a la fructosa es suficiente para que estos animales desarrollen resistencia a la insulina y manifiesten alteraciones funcionales a nivel vascular (El Assar et al., 2015a; El Assar et al., 2015b).

El protocolo que se siguió en el grupo de RC fue exactamente el mismo que con el grupo de RRI, con la única excepción de que las RC no fueron tratadas con fructosa en el agua de bebida.

Obtención de muestras

Tras mantener las ratas en ayunas toda la noche, se pesaron y posteriormente se anestesiaron con diazepam (5 mg/kg) y ketamina (90 mg/kg) por vía intraperitoneal.

El procedimiento quirúrgico consistió en la realización de una toracotomía y una laparotomía. Mediante punción cardíaca en ventrículo derecho se tomó una muestra de

sangre (5-10 ml). La sangre fue recolectada en un tubo sin anticoagulante para la obtención de suero y en un tubo con EDTA para la obtención de plasma. Seguidamente, y tras la identificación de la aorta (**Figura 5**), se procedió a su extracción y disección con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras de disección. A continuación, se expuso el epiplón con el árbol mesentérico y se diseccionó en bloque para, posteriormente, aislar los microvasos mesentéricos de 2º orden.

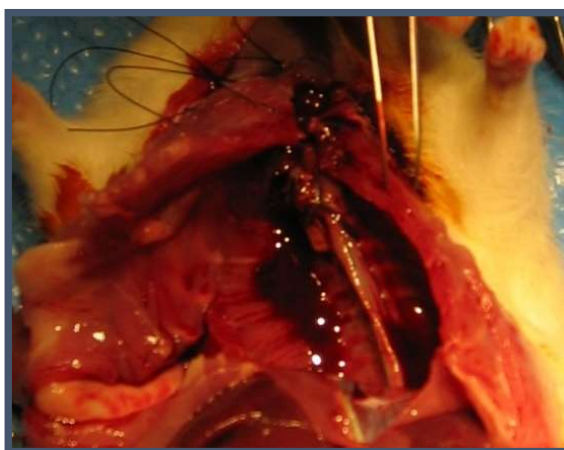


Figura 5. Extracción de aorta torácica en rata Sprague-Dawley.

Hasta el momento de su procesamiento para el estudio de la reactividad vascular unos minutos después, tanto la aorta como el epiplón se mantuvieron a 4°C sumergidos en una solución de Krebs-Henseleit (KHS) con la siguiente composición: 115 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; 4,6 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 4,7 mM MgSO₄; 24,9 mM NaHCO₃; 11 mM glucosa y 0,03 mM Na₂EDTA.

Los dos tubos de sangre se centrifugaron durante diez minutos a 3500 rpm y a 4°C. Una vez separados, el suero y el plasma, se alicuotaron en criotubos y se conservaron congelados a -80°C hasta su procesamiento.

Estudios de reactividad vascular en microvasos - Miógrafo de Mulvany

Arterias de grasa visceral humana

Protocolo experimental

Partiendo de los especímenes de grasa visceral humana (**Figura 6**) se obtuvieron microvasos de un diámetro interno entre 200-500 μm .

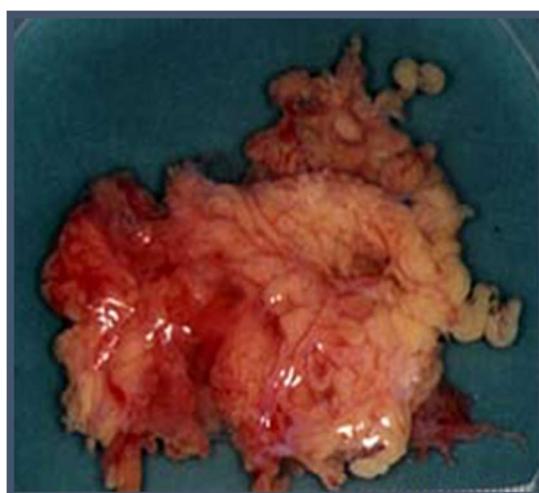


Figura 6. Grasa visceral humana, de la cual se obtuvieron los microvasos de 200-500 μm de diámetro interno.

Para ello, se disecaron las arterias cuidadosamente y se limpiaron del tejido grasa y conectivo que les rodeaba con la ayuda de una lupa quirúrgica. A continuación, se seccionaron las arterias en segmentos de 2 mm de longitud máxima y se dispusieron sobre dos alambres de tungsteno de 40 μm de diámetro en un miógrafo de Halpern-Mulvany (J.P. Trading, Aarhus, Dinamarca) (**Figura 7A**) para el registro de la tensión isométrica siguiendo el protocolo de Vallejo y colaboradores (Vallejo et al., 2000). Uno de los alambres estaba fijo a un transductor de fuerza y el segundo alambre estaba fijado a un tornillo micrométrico de desplazamiento. Ambos alambres se colocaron de forma paralela dentro de la luz del segmento arterial (**Figura 7B**).

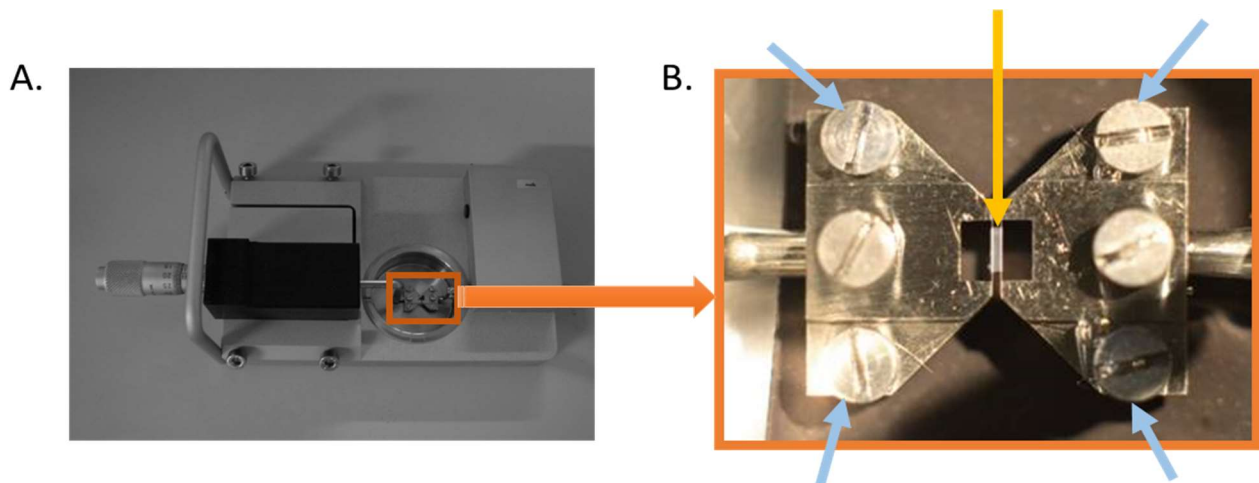


Figura 7. Cámara del miógrafo de Halpern-Mulvany. En la figura 7A se muestra una cámara del miógrafo completa y en la figura 7B se muestra la zona central de la cámara de forma ampliada. En el centro de la imagen 7B se observa un segmento arterial con dos alambres paralelos en el interior, señalado con una flecha amarilla. Estos alambres se fijan a los cuatro tornillos de los extremos de la cámara, señalados con flechas azules.

A lo largo de todo el periodo experimental los segmentos arteriales se encontraban continuamente bañados en una solución de KHS a 37 °C y burbujeadada constantemente con una mezcla de O₂ (95%) y CO₂ (5%) para mantener un pH de 7,4. Tras un periodo de estabilización de 30 minutos, cada segmento arterial se sometió a una sucesión de estiramientos para determinar su tensión pasiva y su diámetro interno (L100) con la ayuda del programa MyoNorm-4 (CIBERTEC S. A.). Se finalizó la distensión del segmento arterial cuando la presión excedió los 100 mm Hg (13,3 kPa). Para la realización de los experimentos con la tensión adecuada, las arterias se dispusieron con una circunferencia interna (L1), siendo $L1 = 0,9 \times L100$ (equivalente al 90% de la presión transmural de 100 mm Hg, a la cual el desarrollo de la fuerza se aproxima al máximo) (Mulvany & Halpern, 1977).

Posteriormente, tras un periodo de equilibrio a la tensión adecuada, se expusieron los segmentos arteriales a 125 mM K⁺ (KKHS, compuesto por KHS con sustitución equimolar de NaCl por KCl) para comprobar la funcionalidad del músculo liso. La tensión fue continuamente grabada mediante un sistema de adquisición de datos (MP100A BIOPAC System, Inc. Santa Bárbara, CA, USA). Tras la contracción se lavaron las cámaras que contenían las arterias cinco veces seguidas, mediante llenado con KHS y posterior vaciado. En el quinto llenado se mantuvieron las arterias reposando en KHS en las

cámaras durante treinta minutos. A continuación, se contrajeron de nuevo los segmentos mediante la adición de 25 mM de K⁺, capaz de producir una contracción del 50-80% de la máxima respuesta a KKHS aproximadamente. La posterior evaluación de las respuestas relajadoras se consiguió mediante la adición sobre las cámaras de concentraciones acumulativas de bradiquinina (BK) con concentraciones de 10 nM a 3 μM a intervalos de dos minutos (**Figura 8**).

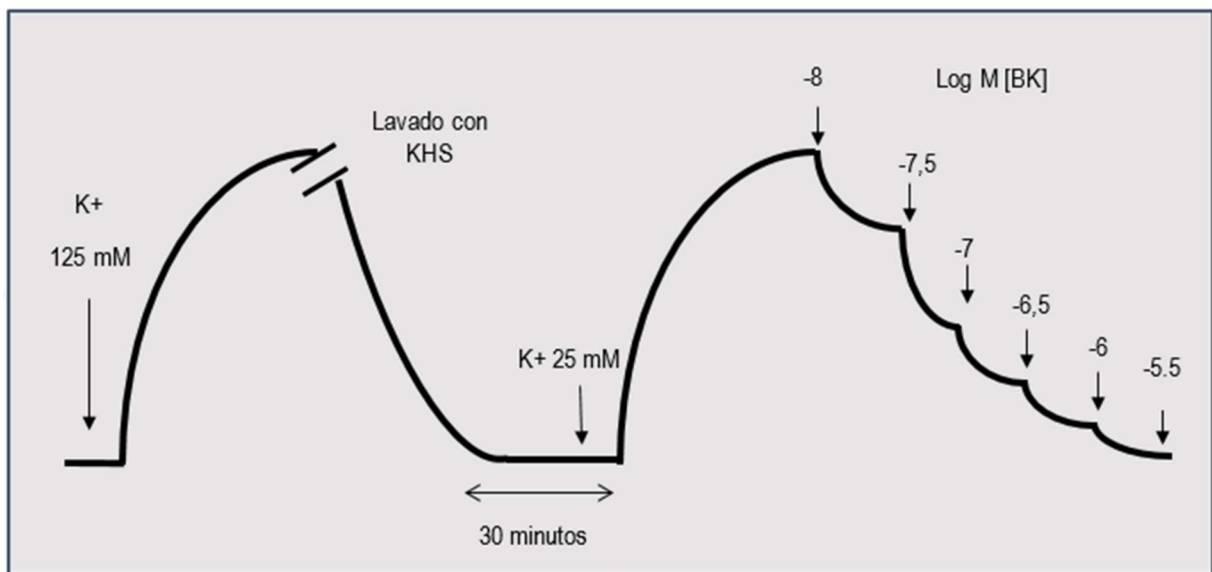


Figura 8. Esquema del proceso de contracción y relajación de los segmentos de arteria de grasa visceral humana.

En otra serie de experimentos, se evaluaron las respuestas vasodilatadoras inducidas por concentraciones crecientes de un donador de NO, nitroprusiato sódico (NPS; 1 nM-1mM).

Arterias mesentéricas de rata

Protocolo experimental

A partir de los especímenes de mesenterio de rata se obtuvieron las arterias mesentéricas (con un diámetro luminal de 200-400 μm) procedentes de la ramificación de 2^o orden (**Figura 9**).



Figura 9. Parte del mesenterio de rata. Señalado con una flecha, la segunda ramificación de la cual se obtuvieron los segmentos arteriales para su montaje en el miógrafo de Mulvany.

El protocolo experimental que se siguió para los estudios de reactividad vascular en microvasos de rata fue similar al de microvasos procedentes de humanos, a excepción de que los segmentos arteriales fueron pre-contraídos con norepinefrina (NE; 1–3 μM). La posterior evaluación de las respuestas relajadoras se consiguió mediante la adición sobre las cámaras de concentraciones acumulativas de acetilcolina (ACh) con concentraciones de 1 nM a 10 μM a intervalos de dos minutos.

Estudios de reactividad vascular en segmentos aórticos- Baño de órganos

Tras su disección y la eliminación de la grasa y el tejido conectivo que la rodeaba, la aorta de rata se colocó en una placa Petri con KHS a 4°C. A continuación, se seccionaron segmentos cilíndricos de 4-5 mm de longitud máxima y se colocaron en un baño de órganos (**Figura 10**).

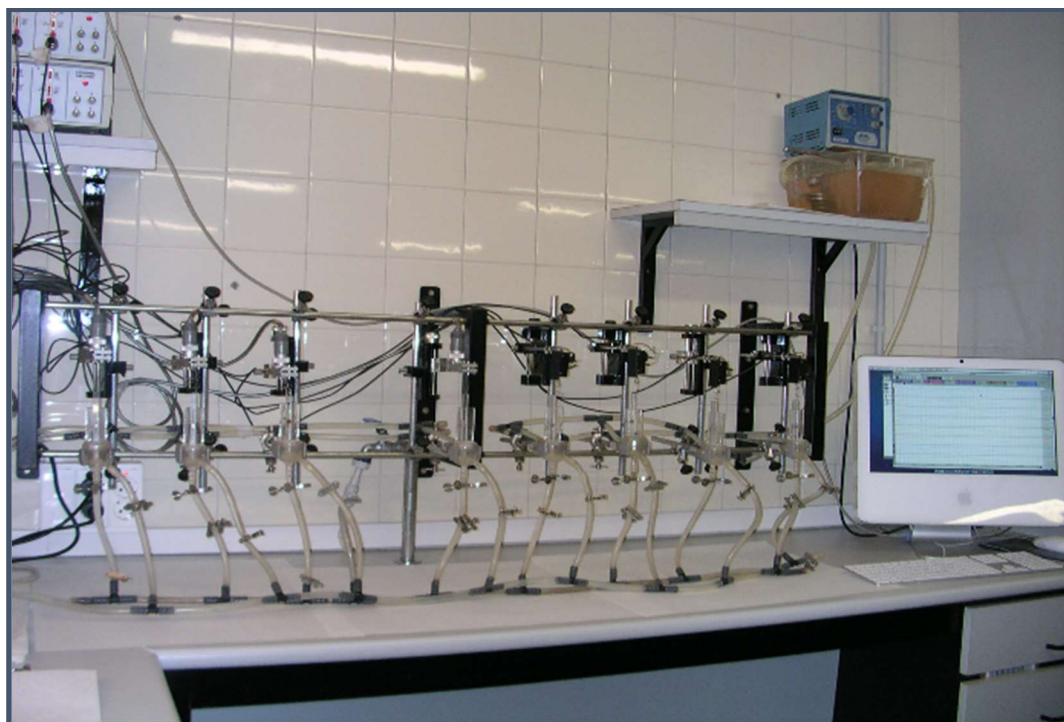


Figura 10. Baño de órganos en serie para montaje de segmentos aórticos.

Posteriormente se hicieron pasar dos alambres por la luz del vaso. Uno quedaba fijo a la pared del baño y el otro, que se podía desplazar de forma paralela al anterior, estaba conectado a un transductor de fuerza y, a su vez, a un sistema de adquisición de datos (MP100A BIOPAC System). El baño de órganos contenía 5 ml de KHS que se mantenía a 37°C y era burbujeadado continuamente con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂ al que proporcionaba un pH entre 7,3 y 7,4 (**Figura 11**). Los segmentos aórticos se sometieron a una tensión basal óptima de 1,5 g que fue reajustada periódicamente hasta su estabilización pasados 60 minutos (Rodríguez-Mañas et al., 2003).

Posteriormente, se expusieron los vasos a 75 mM K⁺ para comprobar su funcionalidad. La tensión fue continuamente registrada mediante un sistema de adquisición de datos (MP100A BIOPAC System). Tras la contracción se lavaron las cámaras que contenían las arterias cinco veces seguidas, mediante llenado con KHS y posterior vaciado. En el quinto llenado se mantuvieron las arterias reposando en KHS en las cámaras durante treinta minutos. A continuación, se contrajeron de nuevo los segmentos aórticos con norepinefrina (10–30 nM) que produjo una contracción del 50-80% de la máxima respuesta a KKHS aproximadamente. La posterior dilatación se consiguió mediante la

adición de concentraciones crecientes de ACh (10 nM - $3\text{ }\mu\text{M}$) a intervalos de dos minutos.

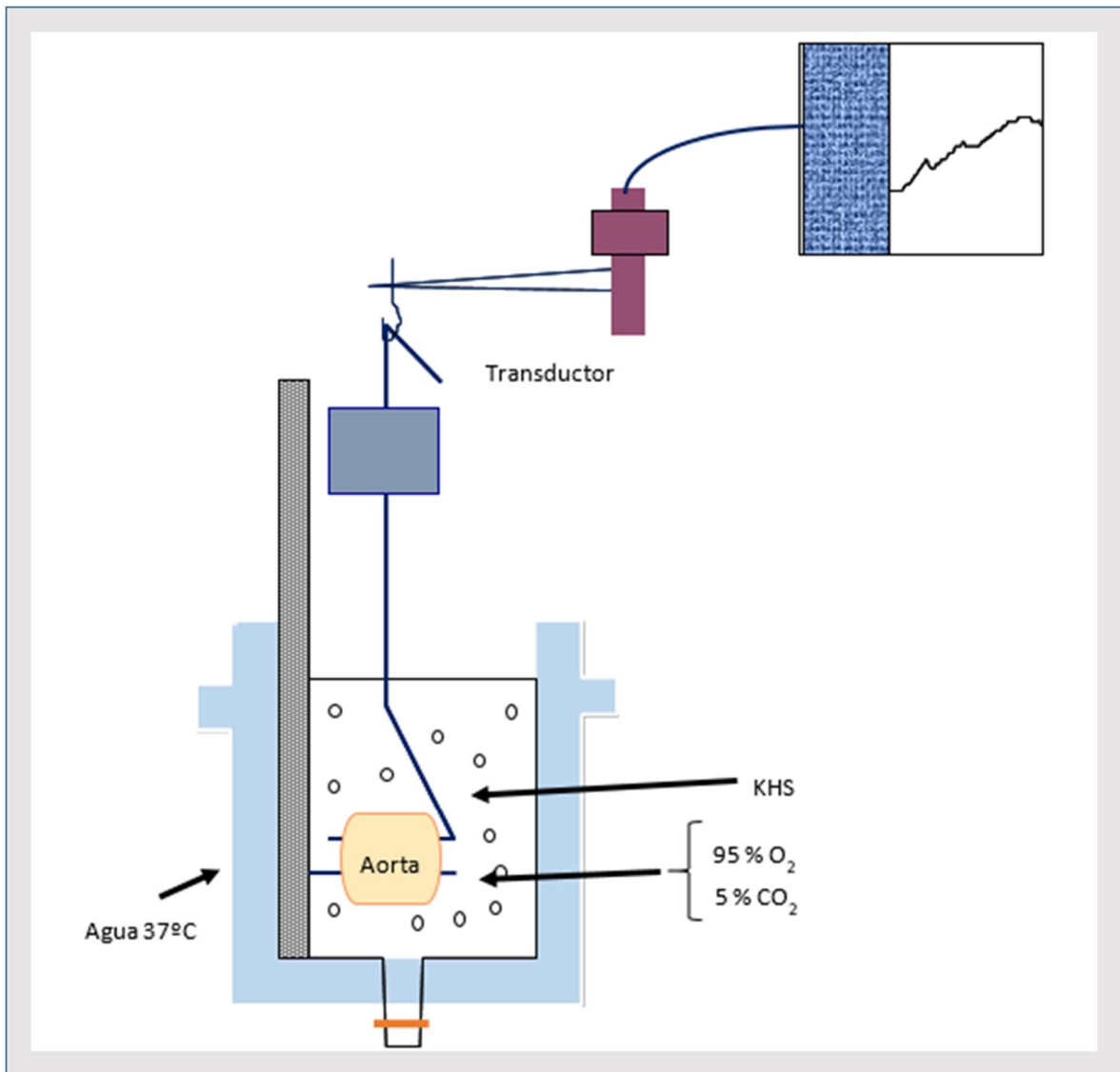


Figura 11. Esquema de un segmento cilíndrico de aorta montado en un baño de órganos.

Protocolos de la modulación farmacológica de las vías de producción de estrés oxidativo y L-arginina/NO

De forma aleatoria algunos segmentos arteriales fueron preincubados con distintos fármacos durante 30 minutos antes de la evaluación de la respuesta vasodilatadora inducida por BK en humanos o ACh en ratas.

Con el objeto de evaluar el papel del estrés oxidativo como posible mecanismo implicado en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina, los segmentos arteriales se preincubaron con barredores del anión superóxido: la superóxido dismutasa (SOD, 100 U/ml), y el 1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxi-piperidina (TEMPOL, 100 μ M). También se evaluaron diferentes fuentes de estrés oxidativo preincubando los vasos con el barredor del anión superóxido a nivel mitocondrial, cloruro de (2-(2,2,6,6-Tetrametilpiperidin-1-oxil-4-ilamino)-2-oxoetil) (mitoTEMPO, 5 μ M), el inhibidor de la NADPH oxidasa, 3-Benzil-7-(2-benzoxazolil) tio-1,2,3-triazolo(4,5-d) pirimidina (VAS 2870, 10 μ M), y el cofactor de la NOS, tetrahidrobiopterina (BH_4 , 10 μ M).

El estudio de la alteración de la vía de L-arginina/NO se realizó tratando o no los vasos con el sustrato de la NOS, L-arginina (300 μ M), y el inhibidor de la arginasa, N ω -hidroxinor-arginina 10 μ M (Nor-NOHA, 10 μ M).

Todos los experimentos fueron desarrollados de manera paralela, estudiándose por un lado los segmentos control sin tratamiento farmacológico y por otro, los segmentos tratados durante 30 minutos con alguno de los fármacos citados anteriormente. Todos los fármacos y reactivos empleados para la realización de los experimentos de reactividad vascular se obtuvieron de Sigma (San Louis, MO, USA) excepto Nor-NOHA, que fue obtenido de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Todos los fármacos se disolvieron en agua destilada, a excepción de la norepinefrina que se diluyó en suero salino (0,9% NaCl) que contenía ácido ascórbico al 0,01% para evitar su oxidación, y el

VAS 2870 que se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO), por recomendación del fabricante.

Estudios bioquímicos

Determinaciones en sangre

Tras la extracción de sangre por venopunción en sujetos y por punción cardiaca en ratas, se procedió a la determinación de glucosa, insulina, ADMA, y arginina. En humanos también se determinaron los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), el perfil lipídico y la proteína C reactiva.

La glucosa, insulina, HbA_{1c}, colesterol total, HDL (lipoproteínas de alta densidad, del inglés *high density lipoproteins*), LDL (lipoproteínas de baja densidad, del inglés *low density lipoproteins*), triglicéridos, y proteína C reactiva en humanos se determinaron en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Getafe. La glucosa, colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, y proteína C reactiva fueron determinados en suero en el auto-analizador Sistema Dimension Vista del laboratorio. Los niveles séricos de insulina se determinaron en el Sistema ADVIACentaur mediante un inmunoensayo tipo sándwich que utilizaba tecnología de quimioluminiscencia directa. La HbA_{1c} se determinó en sangre total en el auto-analizador VARIANT II Hemoglobin Testing System de BIO-RAD, utilizando los principios de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los niveles circulantes de insulina en rata fueron determinados en suero mediante el inmunoensayo de la casa comercial Mercodia (Mercodia AB en Uppsala, Suiza). Los niveles de glucosa en rata se determinaron en suero utilizando el ensayo colorimétrico de Biolabo (Biolabo, SA, Maizy, Francia). La arginina (en plasma) y el ADMA (en suero) tanto en humanos como en ratas se determinaron empleando el ensayo ELISA colorimétrico de la casa USCN (USCN Life Science Inc. de Houston, TX, USA). En todos los casos las determinaciones se realizaron por duplicado y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El índice HOMA-IR, cuyo modelo original fue descrito por Matthews y colaboradores (Matthews et al., 1985), fue calculado tanto para humanos como ratas según la siguiente fórmula (Wallace et al., 2004):

$$\text{Índice HOMA-IR} = (\text{Insulinemia } (\mu\text{U/ mL}) \times \text{Glucemia (mM)}) / 22,5$$

Determinaciones en tejido aórtico de rata

Una parte de la aorta fue destinada para determinar las concentraciones de ADMA, DDAH1 y arginina. Para ello, los segmentos aórticos fueron congelados en nitrógeno líquido directamente tras la extracción y conservados a -80 °C hasta su utilización. Se partió de 30-50 mg de segmentos aórtico conservado a -80 °C y se introdujeron en los tubos MagNa Lyser Green Beads (Roche Diagnostics, Barcelona, España) con 600 μ l de PBS frío. A continuación, se realizaron 3 ciclos de disrupción de 30 segundos a 5000 rpm utilizando el homogenizador eléctrico MagNa Lyser. Entre ciclo y ciclo de homogenización, las muestras y se dejaron reposar en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se sometió el homogenizado a dos ciclos de congelación y descongelación (se introdujeron las muestras en un congelador a -80°C durante 20 minutos y luego se sacaron a temperatura ambiente durante 15 minutos). Posteriormente, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante obtenido de cada muestra a un nuevo tubo que fue congelado a -80°C con el fin de conservar la muestra hasta su determinación.

Cuantificación de proteínas (método BCA)

La medición del contenido proteico en el homogenizado aórtico obtenido anteriormente se efectuó mediante el método del BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (Pierce, Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). La concentración de proteínas se determinó frente a una curva patrón con una solución comercial de albúmina sérica bovina (BSA, Pierce).

Cada muestra fue diluida 3 veces con PBS y se añadió un volumen de 25 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se preparó una mezcla con los reactivos A y B del kit comercial (proporción 50:1) y se añadió 200 μ l de esta mezcla a cada pocillo con las muestras. Se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Como resultado se obtuvo un color púrpura en las muestras que se midió a 570 nm empleando un lector de placas (GENios Plus, TECAN, Männedorf, Suiza) y se calcularon los mg de proteína total. Todas las muestras se procesaron por duplicado.

Determinación de los niveles de ADMA, DDAH1 y arginina

Las determinaciones de las concentraciones de ADMA, DDAH1 y arginina en el homogenizado aórtico procedente de ratas controles y ratas resistentes a la insulina se realizaron por ELISAs (USCN Life Science) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado. Con los valores de ADMA, DDAH1, y arginina obtenidos en el ensayo se calculó la concentración total para cada muestra y se normalizaron respecto a los mg de proteína total presentes en el tejido aórtico de procedencia. Las cantidades de ADMA y DDAH1 se expresaron como ng/mg de proteína, mientras que la cantidad de arginina fue expresada como μ g/mg de proteína.

Determinación de la actividad de arginasa en aorta

Para evaluar la actividad de arginasa se partió de 5-35 mg de tejido aórtico previamente conservado a -80°C. Los segmentos aórticos fueron homogenizados en presencia de 200 μ l de buffer de arginasa y sometidos a 3 ciclos de disrupción de 30 segundos a 5000 rpm utilizando el homogenizador eléctrico MagNa Lyser. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. La actividad arginasa se midió empleando un ensayo colorimétrico comercial (#ab180877; Abcam, Cambridge, Reino Unido) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo se basa en la formación de un producto intermedio derivado de la reacción de la arginasa con la arginina. Este producto reacciona con la sonda Oxired generando un producto coloreado

que fue medido a 570 nm en un método cinético durante 30 minutos a 37°C empleando el lector GENiosPlus. La actividad de la arginasa fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de arginasa} = B / (\Delta T \times V) \times \text{factor de dilución}$$

B = cantidad de H₂O₂ de la curva estándar (nmol)

V = volumen de la muestra añadido a cada pocillo (μl)

ΔT= tiempo de reacción en minutos

La medida de la actividad de arginasa fue normalizada al contenido proteico (medido en mg) procedente de cada muestra.

Determinaciones en grasa visceral de sujetos obesos mórbidos

El protocolo para la determinación de ADMA en grasa visceral de sujetos obesos mórbidos fue similar al empleado para el tejido aórtico de rata, excepto que la muestra de partida fue 200-400 mg de grasa visceral y la cantidad de PBS empleado para la homogenización del tejido en los tubos MagNa Lyser Green Beads fue de 1 ml.

Detección *in situ* del anión superóxido

La detección *in situ* del anión superóxido se realizó empleando la sonda dihidroetidio (DHE), de acuerdo a lo previamente descrito (Rodríguez-Mañas et al., 2009). En presencia de anión superóxido el DHE es oxidado a etidio. Como consecuencia de esta reacción el intercalado del etidio en el ADN da lugar a una fluorescencia roja (**Figura 12**).

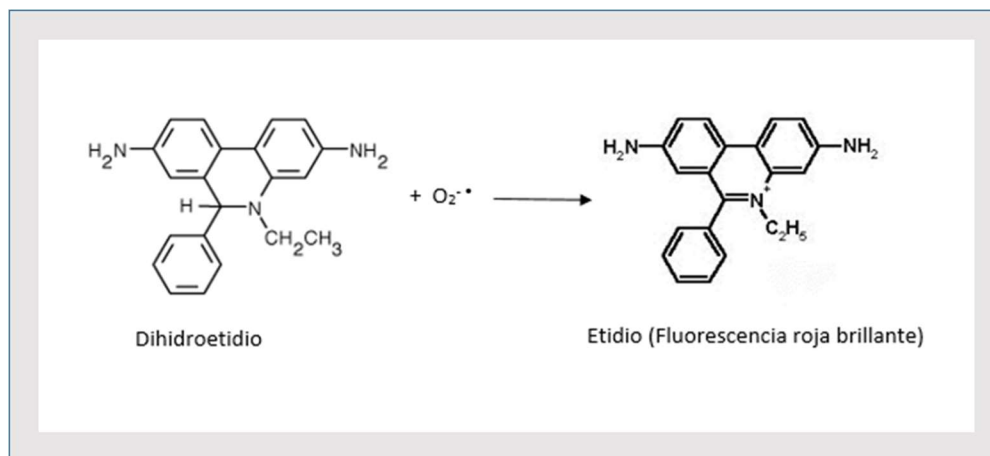


Figura 12. Esquema de formación de etidio a partir de dihidroetidio y anión superóxido.

Protocolo experimental

Partiendo del espécimen de grasa visceral se obtuvieron arterias que fueron sumergidas en paraformaldehído (4 %) durante 2 horas. A continuación, se procedió a su inclusión en parafina de la siguiente forma: En primer lugar, se deshidrataron las muestras mediante sucesivos baños en una secuencia de tres preparaciones de alcohol etílico con graduación creciente. Se empezó por el etanol de 70%, se continuó con el de 96%, y finalmente se transfirió a etanol absoluto. Se realizaron tres cambios en cada graduación, cada uno de ellos de 30 minutos de duración. Después del proceso de deshidratación se aclararon las muestras mediante pasos sucesivos en xilol, realizando dos cambios de 30 minutos de duración. A continuación, se sumergieron en un baño de parafina durante una hora, seguido de otro baño de parafina nueva de una hora y media. En ambos baños la parafina se mantuvo en una estufa a 60 °C. Por último, se confeccionaron los bloques de parafina, al permitir el enfriamiento de la misma, procurando la orientación más favorable de las arterias para conseguir cortes transversales de 5 µm de grosor con la ayuda de un microtomo de rotación (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Los cortes se extendieron en un baño con agua destilada a 37 °C y, posteriormente fueron transferidos a un portaobjetos tratado con polilisina (Sigma). Se depositaron los cortes histológicos en una estufa a 60 °C durante 10 minutos y posteriormente fueron desparafinados aplicando 2 pasos de 15 minutos de xilol, 3 pasos de etanol 100%° y un paso de etanol de 96% y 70%, de 5 minutos cada uno. Seguidamente se sumergieron en una cubeta con agua destilada durante 10

minutos. A continuación, los microvasos fueron sometidos a un tratamiento en el microondas para desenmascarar los epítomos de la siguiente forma: los cortes se sumergieron en un recipiente que contenía tampón citrato (10 mM) compuesto por 0,1 M de ácido cítrico y 0,1 M de citrato sódico a pH 6, y se introdujeron en el microondas aplicando tres pulsos, cada uno de ellos de 3 minutos de duración, a máxima potencia.

Tras 30 minutos de atemperación, se lavaron los cortes en agua destilada durante 10 minutos, seguido de dos lavados en PBS+ 0,1 % Tritón X-100 de 10 minutos. Posteriormente, se delimitaron en cada portaobjeto los segmentos vasculares periféricamente mediante un círculo realizado con un lápiz grasoso PapPen (Sigma). A continuación, las secciones se incubaron con la sonda fluorescente DHE en cámara húmeda (4 μ M; Calbiochem, Darmstadt, Alemania) durante 90 minutos en oscuridad, y en una estufa a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se lavaron los cortes durante 10 minutos con una solución que contenía PBS + 0,1 % Tritón X-100. Este proceso de lavado se repitió tres veces sucesivas. Por último, se tiñeron los núcleos celulares con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI; 300 nM) durante 5 minutos, en cámara húmeda, a 37°C y en oscuridad. Posteriormente, se lavaron los cortes de nuevo tres veces con PBS + Tritón X-100 (0,1%) durante 10 minutos. Tras el último lavado, se procedió a la eliminación del exceso de PBS sacudiendo los portaobjetos suavemente sobre un papel de filtro. A continuación, se añadió una gota de medio de montaje y se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente, los cortes fueron visualizados y se obtuvieron las imágenes digitalizadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Japón).

En algunos cortes se omitió la incubación con la sonda de DHE como control negativo. El porcentaje de núcleos teñidos con la sonda DHE se calculó respecto al total de los núcleos teñidos con DAPI en la pared arterial empleando un software de análisis de imagen (McBiophotonics Image J, NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Análisis de la expresión génica en vasos humanos

Las arterias procedentes de la grasa visceral de los sujetos del estudio destinadas para realizar los estudios de expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se sumergieron en una solución protectora del ácido ribonucleico (ARN) (RNA Later; Sigma) para evitar su degradación. Las arterias se limpiaron del tejido graso y conectivo que las rodeaba y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Extracción de ARN

De 10 a 30 mg de tejido arterial se introdujeron en los tubos MagNA Lyser Green Beads con 600 μl de buffer de lisis RLT para su homogenización empleando el homogenizador eléctrico (MagNA Lyser; Roche) que permitió la rotura completa del tejido mediante la colisión de esferas de cerámica contra el tejido en presencia de buffer de lisis. El protocolo de homogenización consistió en tres ciclos de interrupción de 30 segundos a 7000 rpm. Entre ciclo y ciclo se dejaron las muestras en hielo durante 2 minutos. Tras finalizar la homogenización se procedió a la centrifugación de las muestras durante 3 minutos a 13000 rpm para eliminar restos de muestra no digeridos. Como resultado se obtuvo el sobrenadante que fue transferido a un nuevo microtubo al que se añadió un volumen equivalente de etanol al 70%. Posteriormente se realizó la extracción de ARN mediante el kit "RNeasy Plus Mini" (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este método está basado en hacer pasar a través de una membrana de sílice incluida en cada columna el lisado tisular que previamente había sido homogenizado. El ARN queda atrapado en dicha membrana y, después de una serie de lavados y centrifugaciones que permiten eliminar las proteínas, ADN y otros contaminantes, se eluye el ARN con 30 μl de buffer de elución.

La cantidad del ARN purificado se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando el equipo Nanodrop (ND-100 spectrophotometer; Nanodrop Technology, Montchanin, DE, USA). La comprobación de la pureza se llevó a cabo mediante la

relación de las absorbancias a 260/280 nm, de forma que valores comprendidos entre 1,8 y 2,1 indican que la calidad del ARN obtenido es óptima y adecuada para la técnica de la PCR en tiempo real.

Transcripción Reversa (RT)

Para la síntesis del ADN complementario se utilizó el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Barcelona, España) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se partió de 250 ng de ARN que fue mezclado con los reactivos del kit en un volumen final de 20-30µl. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) definiendo un único ciclo con los siguientes pasos: 10 min a 25° C y 30 min a 37° C. Se añadió un último paso a 85° C durante 5 min para inactivar la retrotranscriptasa. Como resultado se obtuvo el correspondiente ADN complementario (ADNc) que fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

PCR en Tiempo Real

La PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de la fluorescencia generada por sondas que se unen a secuencias específicas del amplicón, conocidas como sondas TaqMan (Applied Biosystems). Las sondas TaqMan están marcadas por dos fluorocromos: un *reporter* que emite fluorescencia al ser excitado (donador, situado en el extremo 3') y un *quencher* que absorbe la energía liberada por el *reporter* (el *quencher* es el aceptor de energía, situado en el extremo 5') que deben estar muy próximos entre sí para que ocurra la transferencia de energía fluorescente. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher*. Sin embargo, durante la amplificación la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, la ADN polimerasa hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del *quencher*. De esta forma aumenta la fluorescencia detectada, al no poder ser absorbida por el *quencher* la energía emitida por el *Reporter* (**Figura 13**). El aumento de la señal de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad del producto de la PCR formado en la reacción.

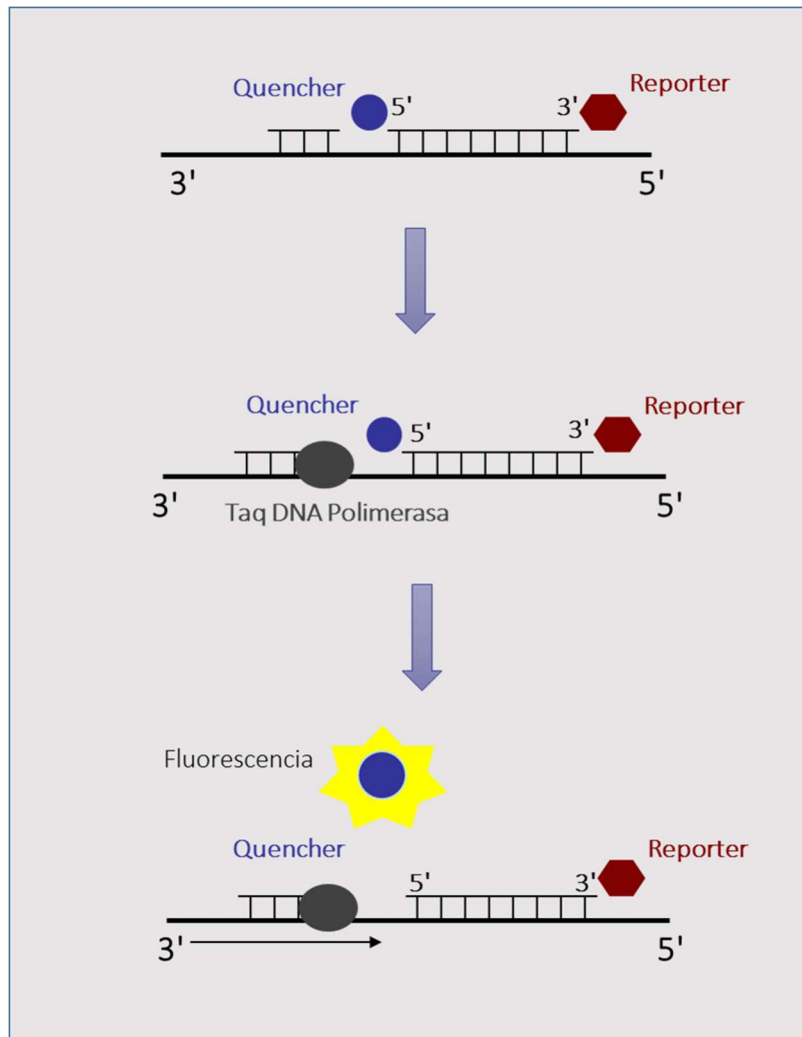


Figura 13. Esquema del mecanismo de acción de la sonda Taqman.

El parámetro fundamental de una PCR en Tiempo Real y en función del cual se van a realizar todos los cálculos y obtención de resultados, es el denominado ciclo umbral (Threshold Cycle o Ct), definido como el número de ciclos de replicación por encima del cual la fluorescencia empieza a detectarse sobre el ruido basal.

La cuantificación relativa del gen diana se realizó utilizando el método $\Delta\Delta CT$ comparativo. Con este método el nivel de expresión relativo del gen diana es dado por la expresión $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001), donde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ OM-RI} - \Delta Ct \text{ OM-NRI}$$

$$\Delta Ct \text{ OM-NRI} = Ct \text{ OM-NRI} - Ct \text{ Gen de referencia (OM-NRI)}$$

$$\Delta Ct \text{ OM-RI} = Ct \text{ OM-RI} - Ct \text{ Gen de referencia (OM-RI)}$$

Los resultados se normalizaron respecto a la expresión de un gen de referencia (utilizado como estándar interno). Este gen de referencia conocido como *housekeeping* suele ser un gen de expresión constitutiva cuya expresión no se ve modificada bajo ningún parámetro experimental del estudio.

Protocolo experimental

La mezcla de reacción de la PCR se realizó en un volumen final de 12 μ l que contenía 25 ng del ADNc, 6 μ l de TaqMan Gene Expression Master Mix 2X, y 0,5 μ l de las sondas TaqMan 20X de diseño comercial específicos para cada gen a estudiar (Life Technologies, Paisley, Reino Unido). Se analizaron los siguientes genes, cada uno de ellos seguido por su referencia: eNOS (Hs00167166_m1), DDAH1 (Hs00201707_m1), DDAH2 (Hs00203889_m1), arginasa-2 (Hs00982833_m1) y GAPDH humano (4326317) como gen de referencia.

Las reacciones de la PCR se transfirieron a una placa de 96 pocillos (Microamp Fast optical 96 well reaction plate de Applied Biosystems) y se sellaron con papel adhesivo óptico. Las reacciones se llevaron a cabo empleando el sistema 7500 Fast real time PCR (Applied Biosystems), según los siguientes parámetros de amplificación ya establecidos y universales para sondas Taqman: 15 segundos a 95 °C desnaturalización, y anillamiento y extensión durante un minuto a 60 °C. Estos dos pasos se repitieron durante 40 ciclos. Para el análisis de resultados se empleó el software SDS v2.3.

Análisis estadístico

El número de sujetos o ratas se indica como N y el número de segmentos vasculares utilizados se indica como n. Los datos de las variables numéricas se expresan como la media \pm error estándar y se analizaron usando la prueba de t de Student cuando se compararon dos grupos o empleando un análisis de varianza (ANOVA) de un factor seguido de un test de Student-Newmann-Keuls para realizar comparaciones múltiples. Este mismo análisis se utilizó para comparar los resultados obtenidos de la cuantificación de las tinciones con la sonda DHE. Los resultados de las variables categóricas fueron analizados mediante el test chi-cuadrado con la ayuda del programa SPSS versión 20. Las curvas de relajación se expresan como el porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por 25 mM K⁺ (en humanos) o por norepinefrina en ratas. Las curvas completas de concentración-respuesta se compararon por un ANOVA de dos factores. El valor de pD₂ se define como como el logaritmo negativo de la concentración necesaria para producir el 50% de la relajación máxima. Los resultados de PCR en tiempo real se expresaron como los niveles relativos de expresión \pm los intervalos de confianza (95%). Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la U de Mann-Whitney. El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa GraphPad Prism 6 y SPSS versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). En todos los casos, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Impacto de la obesidad y la resistencia a la insulina sobre la función vascular humana

Características generales de los sujetos

En la tabla 3 se muestran las diferentes características de los sujetos obesos mórbidos de los cuales se obtuvieron las muestras de los especímenes de grasa visceral. Según se aprecia, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo entre ambos grupos de obesos mórbidos estudiados, siendo el número de pacientes de sexo masculino superior en el grupo de OM-RI.

Más aún, y como era de esperar, el porcentaje de diabéticos fue claramente superior en el grupo de OM-RI, no existiendo ninguno en los OM-NRI y, como consecuencia, el tratamiento con hipoglucemiantes sólo se presentaba en los OM-RI. Además, el porcentaje de sujetos en tratamiento con hipotensores fue significativamente mayor en el grupo de los OM-RI (**Tabla 3**).

No hubo diferencias significativas entre OM-NRI y OM-RI respecto a otras condiciones de comorbilidad y tratamientos recibidos por los sujetos en el momento de la cirugía bariátrica que se muestran también en la tabla 3.

| Datos generales | OM-NRI (N=14) | OM-RI (N=27) | p |
|---------------------------------|---------------|--------------|------------------|
| Datos clínicos | | | |
| Edad (años) | 45,6 ± 3,8 | 41,7 ± 1,9 | 0,376 |
| Sexo (hombre/mujer) | 1/13 | 13/14 | 0,014 |
| IMC (kg/m ²) | 45,0 ± 0,9 | 47,0 ± 1,1 | 0,215 |
| Diabetes Mellitus tipo 2 (%) | 0 | 48,1 | < 0,01 |
| Hipertensión (%) | 21,4 | 51,9 | 0,061 |
| Dislipemia (%) | 14,3 | 25,9 | 0,393 |
| Fumadores activos (%) | 7,1 | 22,2 | 0,224 |
| Tratamiento | | | |
| Tratamiento hipoglucemiante (%) | 0 | 48,1 | < 0,01 |
| Tratamiento hipotensivo (%) | 14,3 | 51,9 | 0,041 |
| Tratamiento hipolipemiante (%) | 0 | 18,5 | 0,097 |

Tabla 3. Resumen de las Características epidemiológicas de los sujetos obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI) y los obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI) estudiados. IMC: índice de masa corporal. Los resultados se expresan como la media ± error estándar o como porcentaje. N representa el número de sujetos estudiados en cada caso. Los valores de p que resultaron estadísticamente significativos se indican resaltados en formato negrita.

En este estudio también se evaluaron los resultados de las diferentes determinaciones bioquímicas realizadas en los sujetos con obesidad mórbida. El grupo de OM-RI presentó valores significativamente más elevados de glucosa, insulina, índice HOMA-IR y de proteína C reactiva. Por el contrario, las concentraciones de colesterol total, HDL y LDL en el grupo de OM-RI eran significativamente inferiores respecto al grupo de OM-NRI (**Tabla 4**). Otras determinaciones bioquímicas realizadas, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de pacientes OM, también se muestran en la tabla 4:

| | OM-NRI (N=14) | OM-RI (N=27) | p |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Determinaciones bioquímicas | | | |
| Glucosa (mg/dl) | 88,4 ± 2,0 | 103,9 ± 2,7 | < 0,01 |
| HbA1c (mmol/mol) | 5,6 (35,18 ± 2,3) | 6,0 (40,44 ± 2,0) | 0,073 |
| Colesterol total (mg/dl) | 184,2 ± 9,6 | 153,9 ± 6,3 | 0,01 |
| HDL (mg/dl) | 47,7 ± 2,5 | 38,5 ± 1,8 | < 0,01 |
| LDL (mg/dl) | 110,8 ± 8,2 | 87,2 ± 5,9 | 0,024 |
| Ratio (Colesterol total/HDL) | 3,9 ± 0,2 | 4,2 ± 0,3 | 0,644 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 100,6 ± 8,4 | 127,3 ± 9,6 | 0,076 |
| Insulina (μU/ml) | 9,5 ± 0,3 | 32,9 ± 4,0 | < 0,001 |
| HOMA-IR | 2,1 ± 0,1 | 8,6 ± 1,2 | < 0,001 |
| Proteína C reactiva (mg/l) | 5 ± 1,0 | 10,9 ± 1,4 | < 0,01 |

Tabla 4. Resumen de las determinaciones bioquímicas en obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI) y obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI). HbA1c: hemoglobina glicosilada, HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, HOMA-IR: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina (Homeostasis Model of Assessment for Insulin Resistance). Los resultados se expresan como la media de valores ± error estándar. N indica el número de sujetos estudiados en cada caso. Los valores de p que resultaron estadísticamente significativos se indican resaltados en formato negrita.

La disfunción endotelial en sujetos obesos mórbidos se asocia con la presencia de resistencia a la insulina

La adición de BK a las cámaras del miógrafo de Mulvany provocó una relajación concentración-dependiente en los microvasos de grasa visceral procedentes de los sujetos obesos mórbidos y controles, siendo las respuestas mostradas por el grupo de OM-RI significativamente menores que la de los sujetos OM-NRI y controles no obesos. Por el contrario, las relajaciones inducidas por BK en vasos de OM-NRI fueron similares a las obtenidas en segmentos procedentes de sujetos sanos no obesos (**Figura 14**). Por tanto, los resultados muestran que la función endotelial está conservada en sujetos obesos en ausencia de resistencia a la insulina.

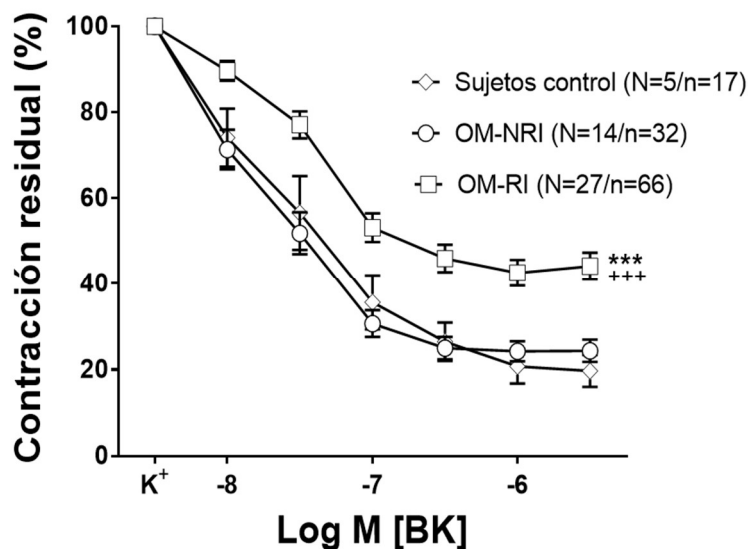


Figura 14. Reducción significativa en la vasodilatación endotelio-dependiente en microvasos obtenidos de sujetos OM-RI. Las relajaciones inducidas por bradiquinina (BK) se estudiaron en arterias de grasa visceral procedentes de obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI), obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI) y sujetos control, sin presencia de obesidad. Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción previa inducida por 25 mM de K⁺. N indica el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales utilizados. *** indica $p < 0,001$ versus OM-NRI. +++ indica $p < 0,001$ versus sujetos control por un test ANOVA de dos factores.

Por otro lado, la exposición al donador de NO, nitroprusiato sódico (NPS), provocó una relajación dependiente de la concentración en los segmentos vasculares de todos los sujetos estudiados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de pD₂ para NPS entre los tres grupos estudiados: $5,59 \pm 0,19$; $4,96 \pm 0,25$ y $5,10 \pm 0,30$ para sujetos control, OM-NRI, y OM-RI, respectivamente.

Dado que existen, como se ha mencionado anteriormente, numerosos parámetros que resultaron estadísticamente significativos al comparar el grupo de OM-RI respecto al grupo de OM-NRI (**tabla 3**, **tabla 4**) se analizó su relación con el deterioro de las relajaciones endotelio-dependiente. En este sentido, la eliminación de los segmentos arteriales pertenecientes al sexo masculino no modificó las respuestas inducidas por BK en ambos grupos de obesos mórbidos, manteniéndose la disfunción endotelial inicialmente manifestada en los OM-RI. Estos resultados refuerzan la idea de que la

disfunción endotelial observada en los sujetos OM-RI está ligada a la presencia de la resistencia a la insulina y es independiente del sexo (**Figura 15**).

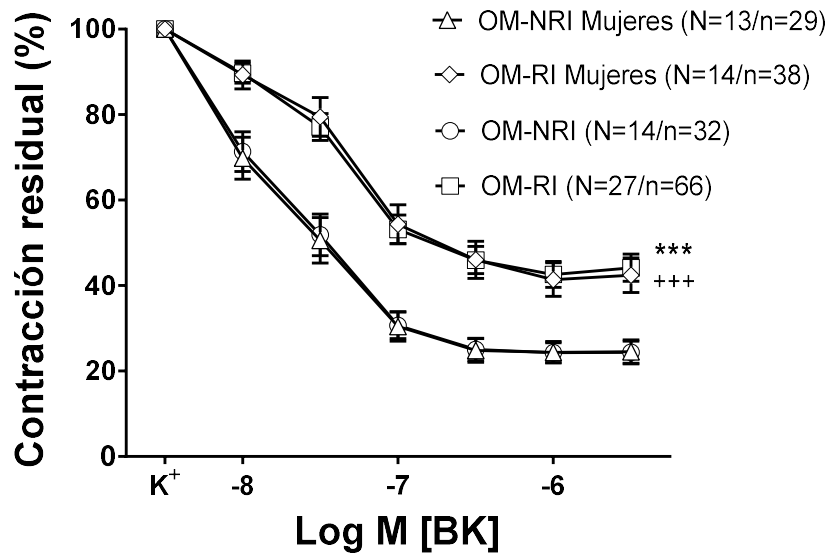


Figura 15. El sexo no es un factor influyente en las respuestas vasodilatadoras inducidas por bradiquinina (BK) en arterias procedentes de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos. Grupos: Mujeres obesas mórbidas no resistentes a la insulina (OM-NRI Mujeres), mujeres obesas mórbidas resistentes a la insulina (OM-RI Mujeres), obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI) y obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de la contracción previa inducida por 25 mM K⁺. N indica el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales utilizados. $p < 0,001$ versus OM-NRI está representada como *** en la figura y +++ indica $p < 0,001$ versus OM-NRI Mujeres por un test ANOVA de dos factores.

También se evaluó el impacto de la presencia/ausencia de la diabetes sobre la disfunción endotelial entre los sujetos obesos mórbidos. La presencia de este factor de riesgo no se asocia con un mayor deterioro de la relajación endotelio-dependiente en arterias mesentéricas en OM-RI. De hecho, la curva de relajación inducida por BK en OM-RI con diabetes fue similar a la de OM-RI no diabéticos. Eso indica que la disfunción endotelial observada en los OM-RI está relacionada con la presencia de resistencia a la insulina más que con la presencia de diabetes (**Figura 16**).

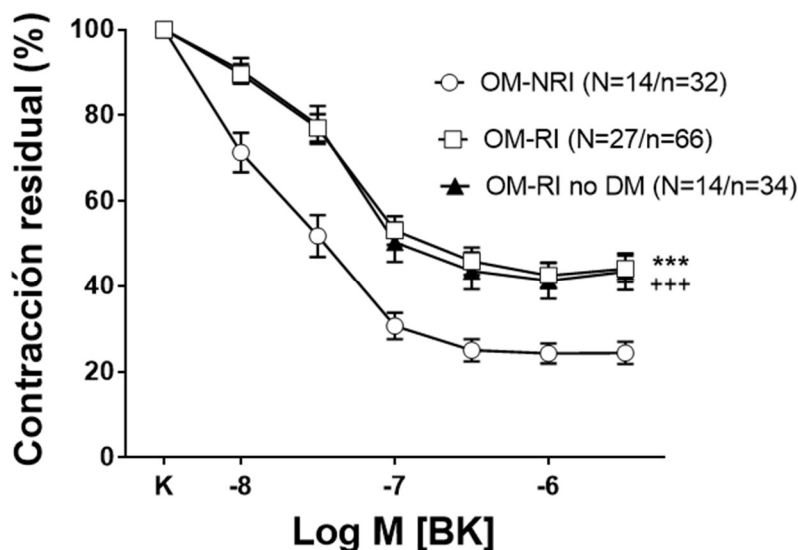


Figura 16. La presencia de diabetes mellitus (DM) no agrava las respuestas vasodilatadoras inducidas por bradiquinina (BK) en arterias procedentes de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina. Grupos: obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI), obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI) y obesos mórbidos resistentes a la insulina no diabéticos (OM-RI no DM). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus OM-NRI, +++ indica $p < 0,001$ versus OM-NRI, ambos por un test ANOVA de dos factores.

Más aún, el análisis de los valores de pD_2 de los sujetos obesos mórbidos en función de los diferentes factores estudiados (Tabla 4), reveló que el índice HOMA-IR resultó ser el único factor que se correlacionaba inversamente con los valores de pD_2 para cada sujeto obeso (Figura 17).

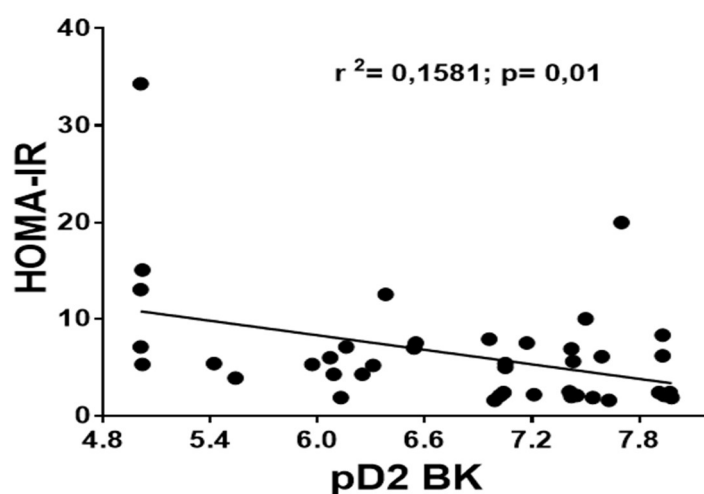


Figura 17. Correlación inversa entre el índice HOMA-IR y el valor de pD_2 para cada sujeto obeso mórbido. pD_2 es el logaritmo negativo de la concentración de BK necesaria para obtener el 50 % de la relajación máxima. Cada punto representa la media de los valores de pD_2 de los segmentos vasculares obtenidos de cada sujeto.

Impacto de la resistencia a la insulina sobre la función vascular en un modelo animal

Para reforzar los resultados obtenidos en humanos y confirmar que la disfunción endotelial está determinada por la presencia de la resistencia a la insulina y no por otros mecanismos potenciales asociados a la obesidad, se llevaron a cabo determinaciones similares en un modelo animal de resistencia a la insulina que no se asocia con obesidad: ratas tratadas con fructosa.

La administración durante ocho semanas de fructosa al 20 % en agua de bebida en ratas macho de 4-5 semanas de edad produjo una hiperglucemia marcada respecto al grupo de RC no tratadas (**Tabla 5**). Otro de los parámetros importantes en la homeostasis glucídica es la hiperinsulinemia. Los resultados conseguidos empleando un ELISA para la determinación de insulina en nuestro modelo de resistencia a la insulina en rata, constatan que la administración de fructosa produce un aumento superior al 300% en los niveles séricos de insulina respecto a los valores de ratas control. Una vez confirmado que nuestro modelo animal presenta hiperglucemia e hiperinsulinemia se procedió al cálculo del Índice HOMA-IR según el modelo matemático presentado por Matthews y colaboradores (Matthews et al., 1985).

Las ratas tratadas con fructosa en agua de bebida muestran un incremento significativo ($p < 0,001$) en el índice HOMA-IR respecto al grupo control (**Tabla 5**), lo cual demuestra que estas ratas presentan resistencia a la insulina. Por tanto, de modo similar a lo observado en sujetos obesos mórbidos, en nuestro modelo animal de resistencia a la insulina se confirma la presencia de hiperinsulinemia e hiperglucemia. La principal diferencia entre el modelo animal y los sujetos obesos mórbidos radica en la ausencia de obesidad en RRI. Estas ratas presentaban un sobrepeso ligero sin alcanzar una significancia estadística con respecto al grupo de RC (**Tabla 5**).

| | RC (N=8) | RRI (N=12) |
|-----------------|---------------|-------------------|
| Peso (g) | 408 ± 20,29 | 449 ± 13,83 |
| Glucosa (mg/dl) | 123,5 ± 11,16 | 254,6 ± 22,60 *** |
| Insulina (µg/L) | 1,47 ± 0,22 | 4,59 ± 0,61 *** |
| HOMA-IR | 1,00 ± 0,13 | 6,40 ± 0,94 *** |

Tabla 5. Resumen de los parámetros generales medidos en ratas resistentes a la insulina (RRI), tratadas con fructosa en agua de bebida y ratas control (RC). Los datos fueron expresados como el valor de la media ± error estándar. Los valores de HOMA-IR se presentan como valores relativos respecto a las RC. N indica el número de ratas utilizadas. $p < 0,001$ versus RC se representa como *** en la tabla. Los datos fueron comparados con el test t de Student para dos muestras independientes.

La función endotelial está deteriorada en arterias procedentes de RRI no obesas

Para la evaluación del impacto de la resistencia a la insulina, independientemente de la obesidad, sobre la función endotelial se realizaron estudios de reactividad vascular en RRI, así como en RC. La adición acumulativa de ACh al baño de órganos resultó en una relajación dependiente de la concentración de los segmentos vasculares contraídos con norepinefrina en ambos grupos de animales, siendo las respuestas mostradas por las RRI significativamente menores respecto a las respuestas de las RC. Éste fenómeno se observó tanto en segmentos arteriales de gran calibre (aorta) (**Figura 18A**), como en los de pequeño calibre (microvasos mesentéricos) (**Figura 18B**) de ratas no obesas.

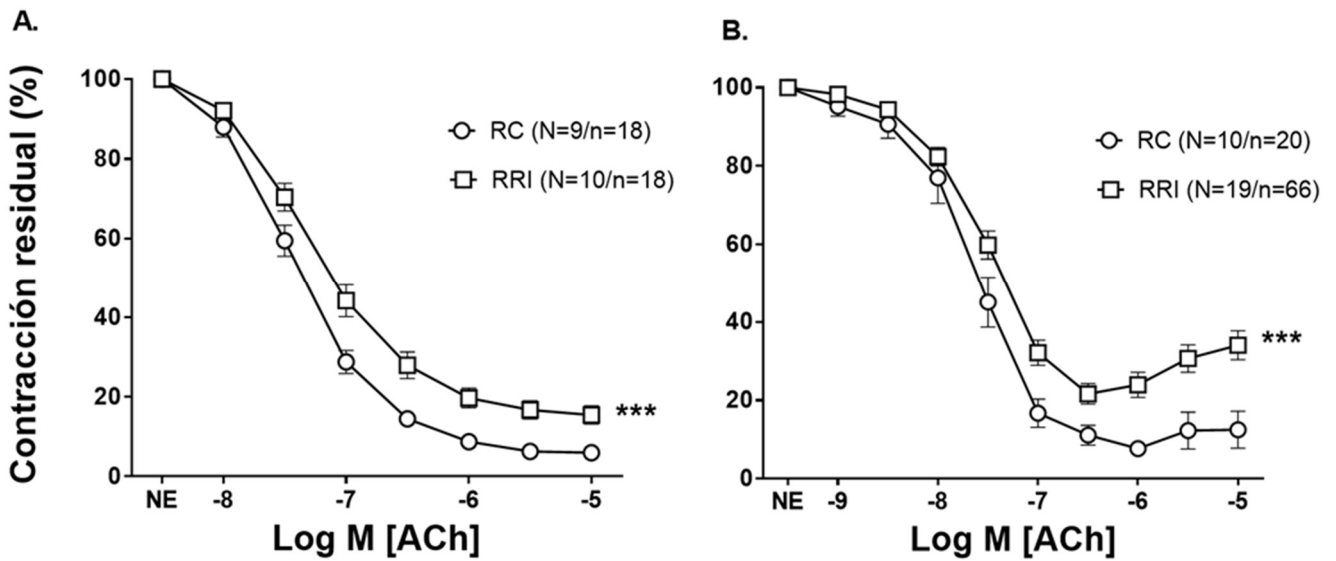


Figura 18. Respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en aortas (panel A) y en arterias mesentéricas (panel B) procedentes de ratas control (RC) y resistentes a la insulina (RRI). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta a norepinefrina (NE). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RC por un test ANOVA de dos factores.

Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las relajaciones inducidas por NPS en los segmentos aórticos y en arterias mesentéricas procedentes de RRI en comparación con las RC (valores pD_2 : $8,17 \pm 0,06$ versus $8,31 \pm 0,132$; y $7,02 \pm 0,20$ versus $6,73 \pm 0,17$ en aorta y arterias mesentéricas de RC y RRI respectivamente).

Mecanismos implicados en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en un modelo animal

La disfunción endotelial se asocia con presencia de estrés oxidativo en OM-RI y RRI

Para testar si el aumento de estrés oxidativo juega un papel en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos, se preincubaron los

segmentos vasculares procedentes de grasa visceral de los sujetos OM-RI con el detoxificador del anión superóxido, SOD (100 U/ml). El tratamiento con SOD, incrementó significativamente las respuestas endotelio-dependientes inducidas por BK en OM-RI (**Figura 19A**). Sin embargo, la SOD no modificó las respuestas vasculares a BK en el grupo de OM-NRI (**Figura 19B**).

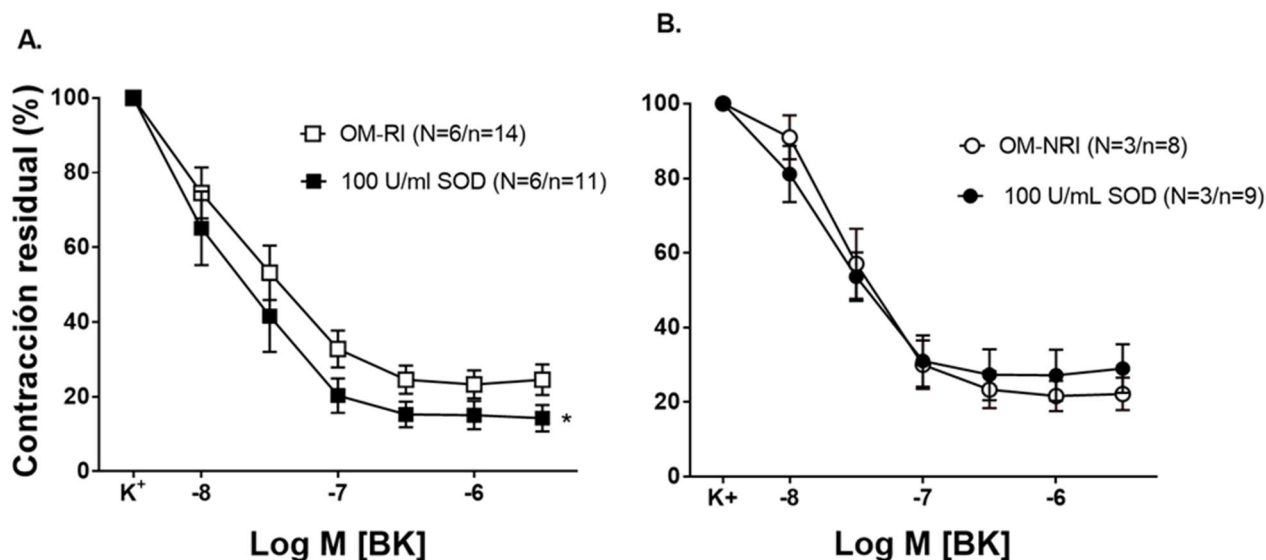


Figura 19. Efecto de la detoxificación del anión superóxido con SOD (100 U/ml) sobre las relaciones inducidas por bradiquinina (BK) en arterias de obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI, panel A) y obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI, panel B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por 25 mM K⁺. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales utilizados. * indica $p < 0,05$ respecto a OM-RI por un test ANOVA de dos factores.

Por tanto, los estudios funcionales de reactividad vascular avalan la implicación del radical superóxido en el deterioro de las relaciones endotelio-dependientes en vasos procedentes de sujetos OM-RI. Más aún, para confirmar el resultado funcional, se utilizaron técnicas de imagen. Para determinar la presencia del anión superóxido en la pared vascular se utilizó la sonda fluorescente DHE. La cantidad de anión superóxido es directamente proporcional al porcentaje de núcleos con tinción fluorescente positiva al DHE (señal roja). En los cortes histológicos de los microvasos mesentéricos procedentes de OM-RI (**Figura 20C**) el número de núcleos positivos al DHE fue claramente superior en comparación con los vasos procedentes de los OM-NRI (**Figura 20B**) y con los vasos del grupo control no obeso (**Figura 20A**). Este marcaje se aprecia en todas las capas de la pared vascular.

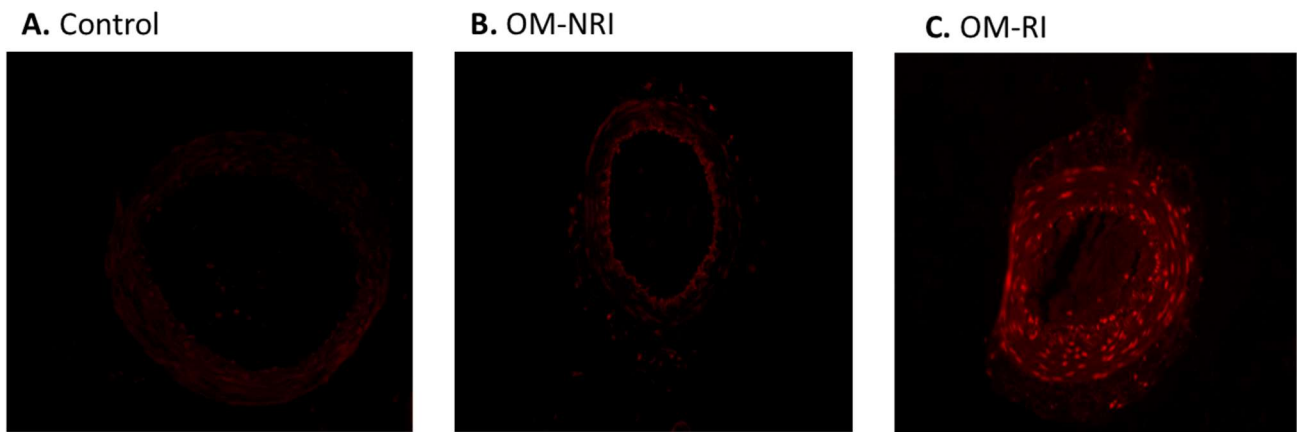


Figura 20. Microfotografías representativas de la detección del anión superóxido con la sonda dihidroetidio (DHE) en cortes procedentes de grasa visceral de sujetos: A) control, B) obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI), y C) obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de X20 aumentos.

Estos hallazgos se confirmaron a nivel cuantitativo, detectándose un incremento significativo de la producción de anión superóxido en la pared arterial de los sujetos OM-RI respecto al grupo de OM-NRI y los sujetos control (**Figura 21**).

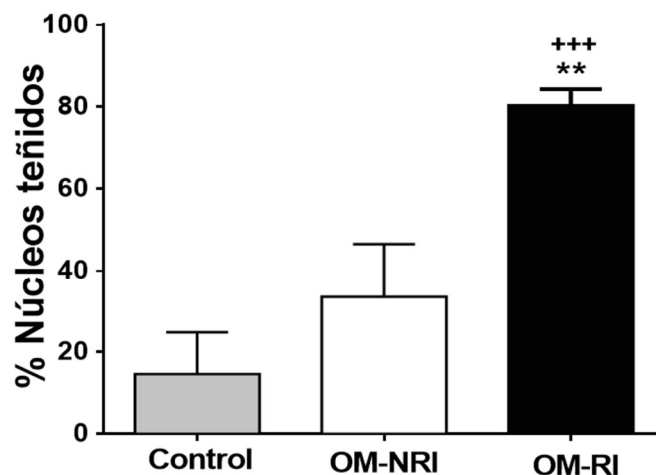


Figura 21. Análisis cuantitativo de la producción del anión superóxido. Los datos se expresan como la media \pm error estándar del número de núcleos con fluorescencia roja para DHE normalizada respecto al número total de núcleos teñidos con DAPI. +++ indica $p < 0,001$ respecto a control. ** indica $p < 0,01$ respecto a OM-NRI. Los resultados fueron calculados por un test ANOVA de un factor seguido por un test de Student-Newmann-Keuls.

Más aún, la generación del anión superóxido se correlaciona inversamente con los valores de pD2 para BK, obteniéndose peores relajaciones endoteliales a medida que aumentaba el porcentaje de núcleos teñidos (**Figura 22**). De ésta forma, nuestros estudios revelan que el estrés oxidativo se relaciona tanto con la resistencia a la insulina, como con la disfunción endotelial asociada a este factor de riesgo cardiovascular.

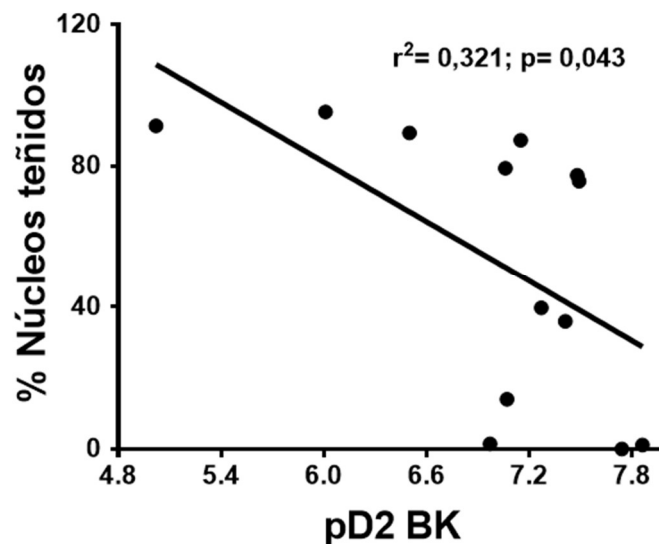


Figura 22. Correlación negativa entre el porcentaje de núcleos teñidos en cortes histológicos de segmentos vasculares de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos y controles y el valor de pD2 para BK. Cada punto representa la media de los valores de pD2 de los segmentos vasculares obtenidos de cada sujeto.

De modo similar a lo observado en los sujetos obesos mórbidos con resistencia a la insulina, la preincubación de los anillos aórticos (**Figura 23A**) y los microvasos mesentéricos (**Figura 23B**) de RRI con el mimético de la SOD, TEMPOL (100 μ M), resultó en una potenciación de las relajaciones inducidas por ACh.

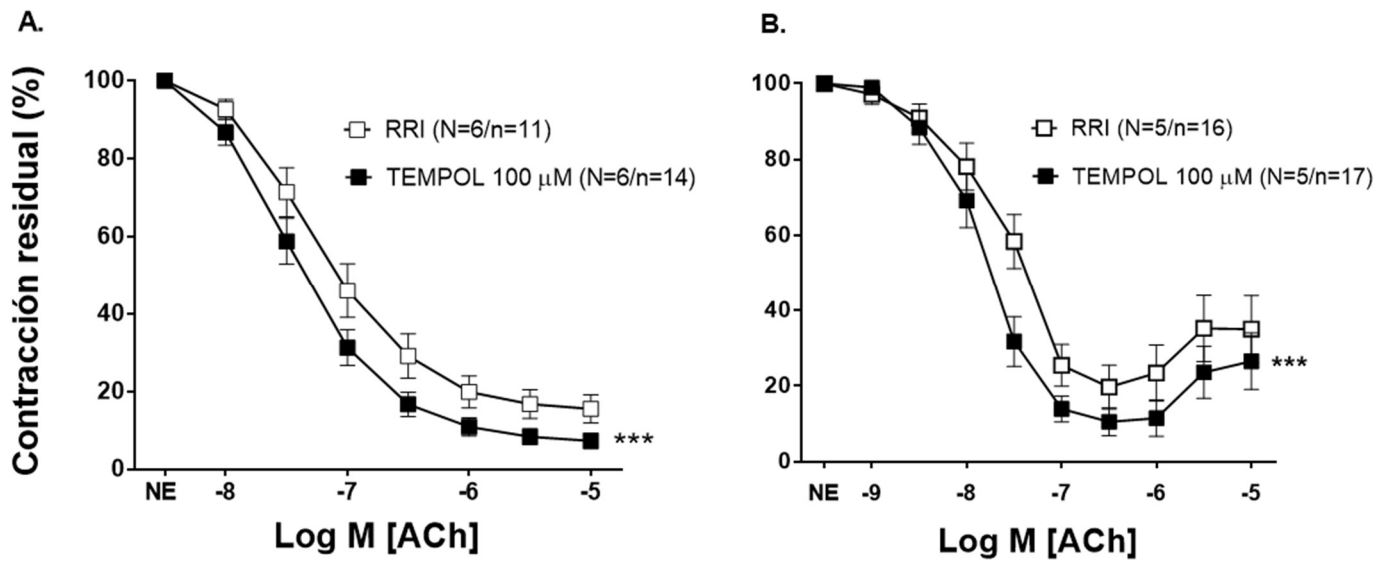


Figura 23. El tratamiento con TEMPOL (100 µM) mejoró las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en segmentos de aorta (A) y en arterias mesentéricas (B) de ratas resistentes a la insulina (RRI). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI por un test ANOVA de dos factores.

Sin embargo, en RC las relajaciones inducidas por ACh fueron similares en magnitud en los segmentos aórticos (Figura 24A) y mesentéricos (Figura 24B) tratados con TEMPOL a las respuestas observadas en los segmentos no tratados.

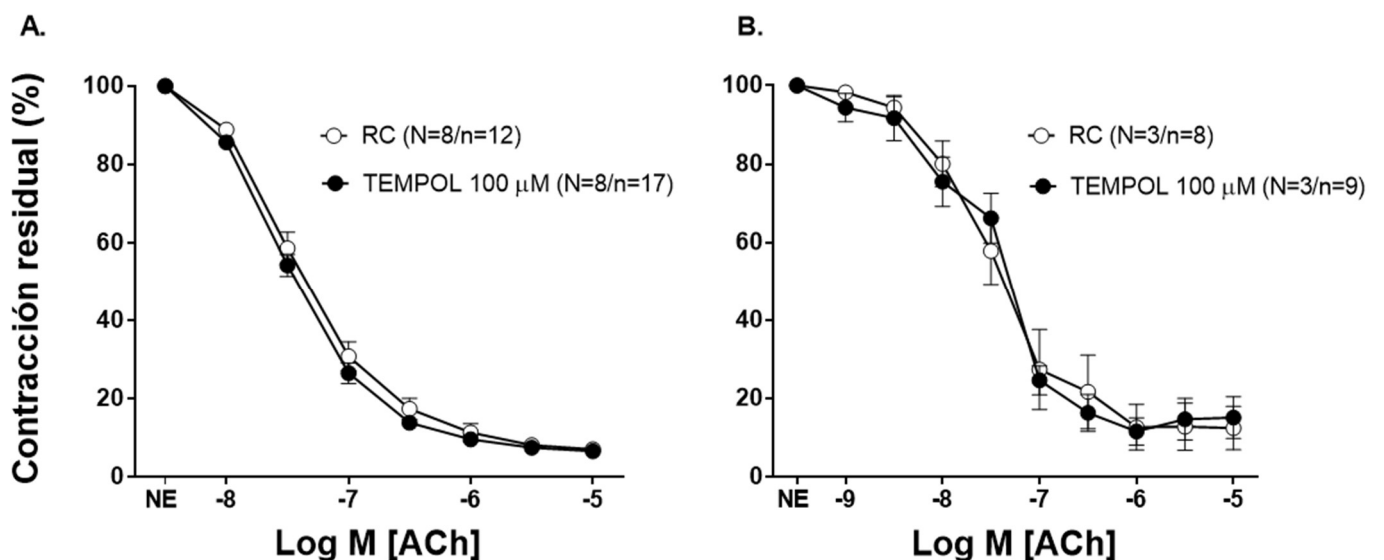


Figura 24. Efecto del TEMPOL (100µM) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en aortas (panel A) y en microvasos mesentéricos (panel B) de ratas control (RC). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados.

Tras comprobar la implicación del estrés oxidativo en el déficit de las respuestas endoteliales en el contexto de la resistencia a la insulina en obesos mórbidos y en ratas, se procedió a la evaluación de las diferentes fuentes generadoras de estrés oxidativo a nivel vascular. En este sentido se analizó el papel de la mitocondria, la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la NOS.

La reducción del estrés oxidativo mitocondrial mejora las respuestas vasodilatadoras en OM-RI y en aortas de RRI.

Para evaluar la implicación del estrés oxidativo de origen mitocondrial a nivel funcional, se realizaron estudios de reactividad vascular preincubando algunos segmentos vasculares procedentes de los sujetos obesos mórbidos con mitoTEMPO, el mimético mitocondrial de la SOD. El tratamiento agudo de las microarterias de OM-RI con mitoTEMPO (5 μ M) mejoró de forma significativa las relajaciones endotelio-dependientes inducidas por BK (**Figura 25A**). Sin embargo, no tuvo efecto sobre las respuestas relajantes en el grupo de OM-NRI (**Figura 25B**).

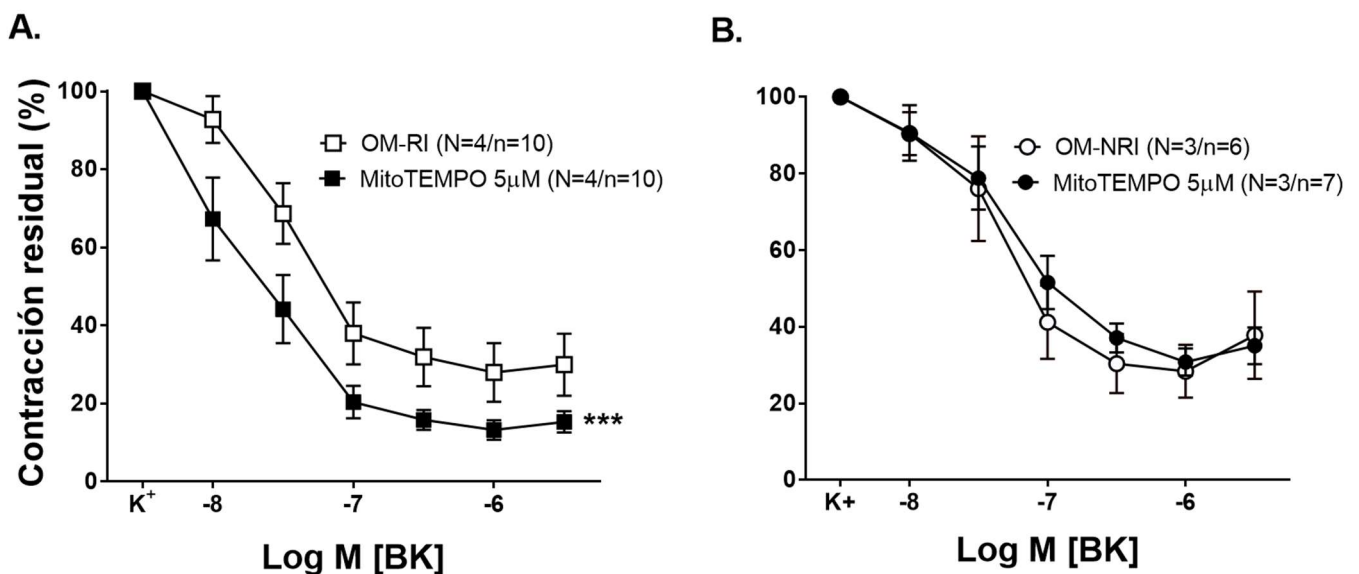


Figura 25. Efecto de la preincubación con el detoxificador del anión superóxido mitocondrial, mitoTEMPO (5 μ M) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por bradiquinina (BK) en arterias procedentes de grasa visceral de **A)** obesos mórbidos con resistencia a la insulina (OM-RI) y **B)** obesos mórbidos sin resistencia a la insulina (OM-NRI). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de las respuestas inducidas por 25 mM K⁺. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus OM-RI por un test ANOVA de dos factores.

Para poner de manifiesto la disminución en la producción del anión superóxido en presencia de mitoTEMPO, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia utilizando la sonda de DHE. Como se puede observar en la **Figura 26B**, el tratamiento de las microarterias de OM-RI con mitoTEMPO resultó en una disminución significativa del número de núcleos con tinción fluorescente positiva al DHE en comparación con el grupo de OM-RI no tratados (**Figura 26A**)

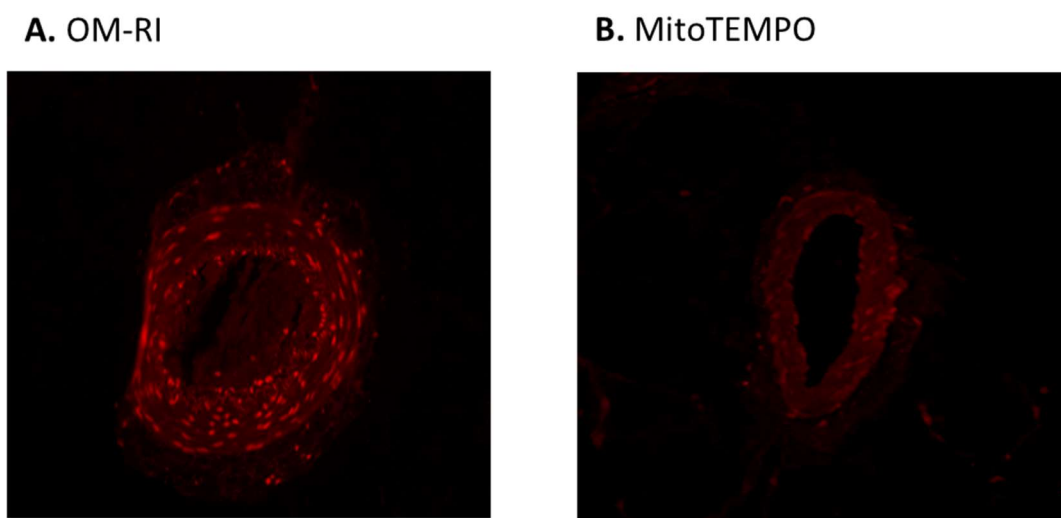


Figura 26. Microfotografías representativas de la detección del anión superóxido con la sonda dihidroetidio (DHE) en cortes procedentes de grasa visceral de sujetos: A) obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI) y B) obesos mórbidos resistentes a la insulina tratados con mitoTEMPO (5 μ M). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de X20 aumentos.

Además, el análisis cuantitativo de la producción de anión superóxido (**Figura 27**) también demostró una disminución significativa del porcentaje de núcleos teñidos en los segmentos mesentéricos de OM-RI tratados con mitoTEMPO.

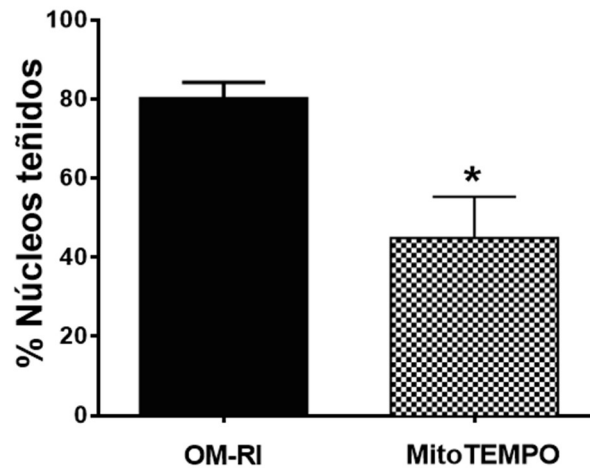


Figura 27. Análisis cuantitativo de la producción del anión superóxido. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de la fluorescencia roja del DHE normalizada respecto a la fluorescencia azul del DAPI. * indica $p < 0,05$ respecto a respecto a OM-RI. Los resultados fueron calculados por un test ANOVA de un factor seguido por un test de Student-Newmann-Keuls.

Más aún, el tratamiento de los segmentos aórticos procedentes de RRI, no obesas, con mitoTEMPO también mejoró la respuesta endotelial de modo significativo (**Figura 28A**). Sin embargo, el mitoTEMPO redujo de forma significativa las respuestas vasodilatadoras inducidas por ACh en las aortas procedentes de las ratas control (**Figura 28B**).

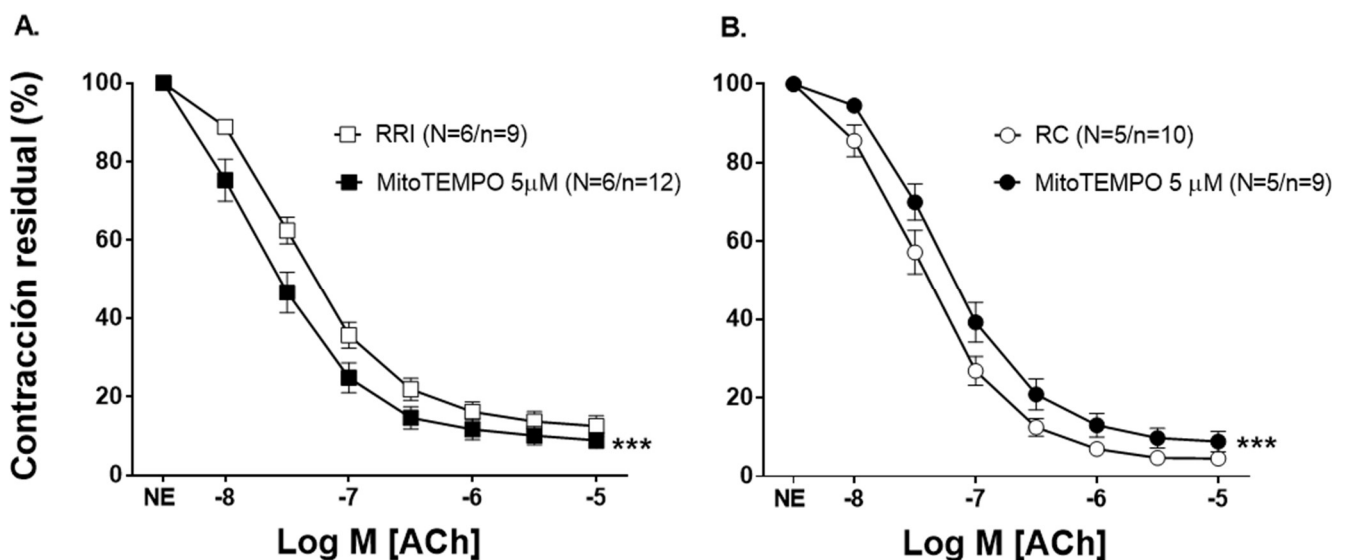


Figura 28. Efecto de la incubación con el detoxificador del anión superóxido mitocondrial, mitoTEMPO (5 μ M), en aortas de ratas resistentes a la insulina (RRI; panel A) y de ratas control (RC; panel B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual en respuesta a norepinefrina (NE; 10–30 nM). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI (A) o versus RC (B) por un test ANOVA de dos factores.

Por el contrario, el tratamiento con mitoTEMPO no produjo modificación de las relajaciones inducidas por ACh en los vasos de pequeño calibre procedentes tanto de RRI (**Figura 29A**) como de RC (**Figura 29B**). Estos resultados descartan la participación del estrés oxidativo de origen mitocondrial en la alteración microvascular asociada a la resistencia a la insulina en nuestro modelo animal de rata tratada con fructosa.

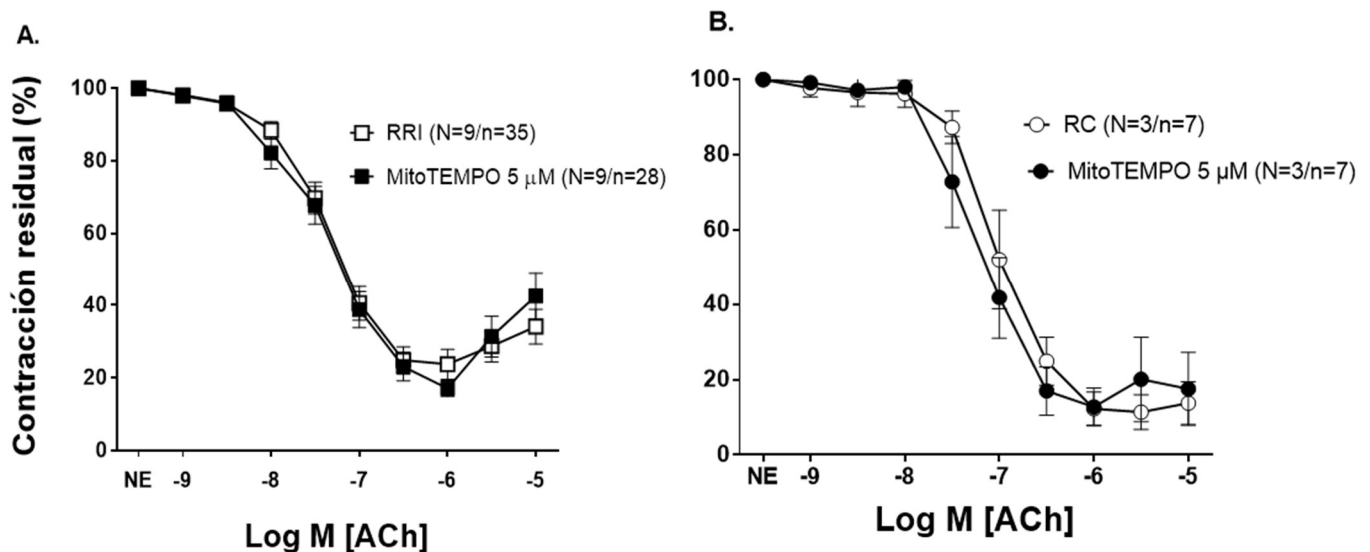


Figura 29. Efecto del tratamiento con mitoTEMPO (5 μ M) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en arterias mesentéricas obtenidas de ratas resistentes a la insulina (RRI; panel A) y de ratas controles (RC; panel B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (1-3 μ M). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados.

La inhibición de la NADPH oxidasa no modifica las respuestas vasodilatadoras en OM-RI, pero sí potencia la relajación en los vasos de pequeño calibre en RRI.

Otro sistema generador de estrés oxidativo es la NADPH oxidasa, considerada una de las principales fuentes de anión superóxido a nivel vascular. La preincubación de los microvasos de los sujetos OM-RI con el inhibidor de la NADPH oxidasa, VAS 2870 (10 μ M) no palió el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes (**Figura 30A**). Tampoco tuvo efecto sobre las respuestas inducidas por BK en OM-NRI (**Figura 30B**).

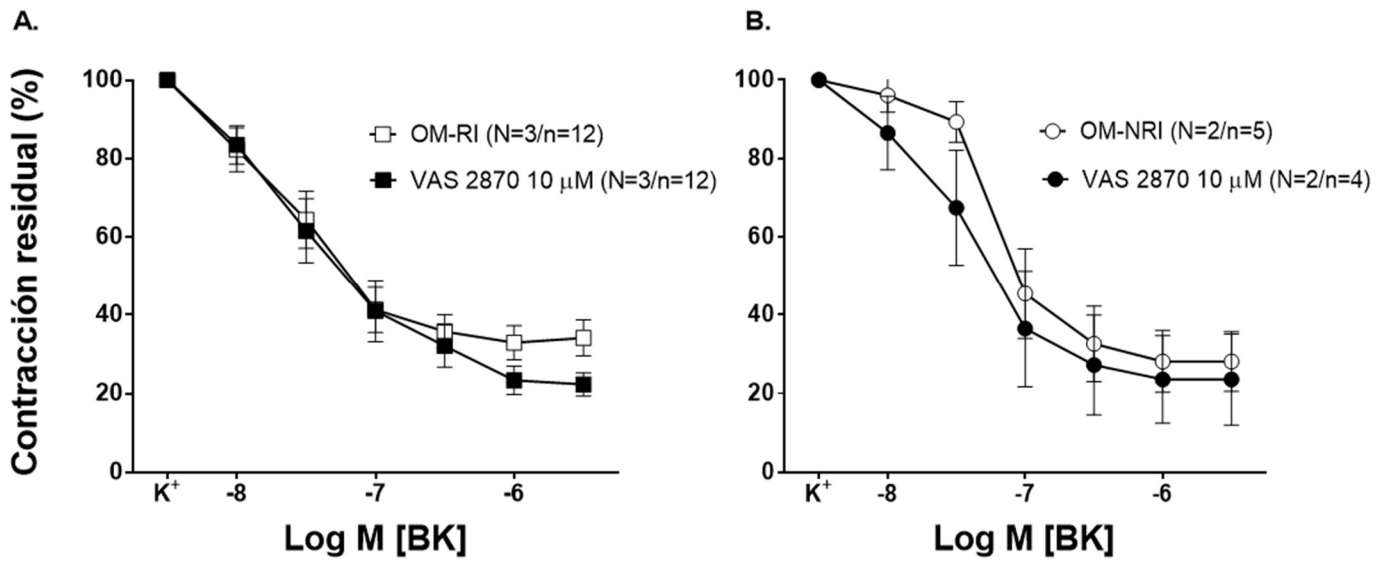


Figura 30. Efecto de la preincubación con el VAS 2870 (10 µM) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por bradiquinina (BK) en arterias procedentes de grasa visceral de A) sujetos obesos mórbidos con resistencia a la insulina (OM-RI) y B) sujetos obesos mórbidos sin resistencia a la insulina (OM-NRI). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de las respuestas inducidas por 25 mM K⁺. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales estudiados.

En nuestro modelo animal de resistencia a la insulina la preincubación de los segmentos aórticos con VAS 2870 (Figura 31) supuso un empeoramiento evidente de la relajación endotelio-dependiente tanto en RRI (Figura 31A) como en RC (Figura 31B).

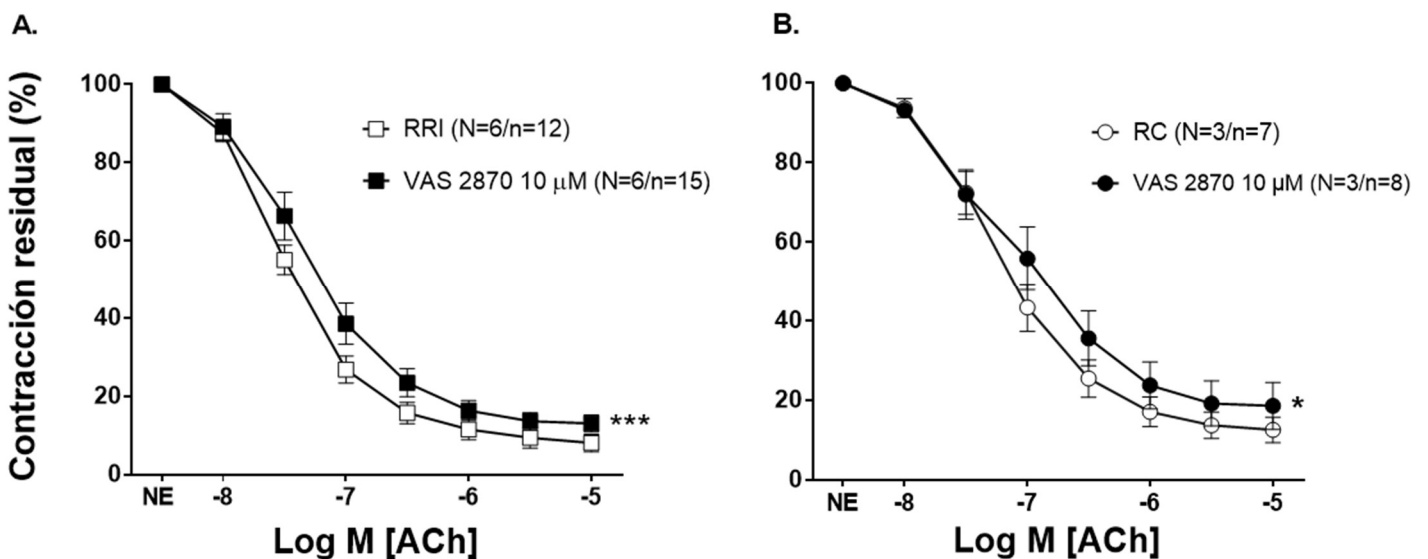
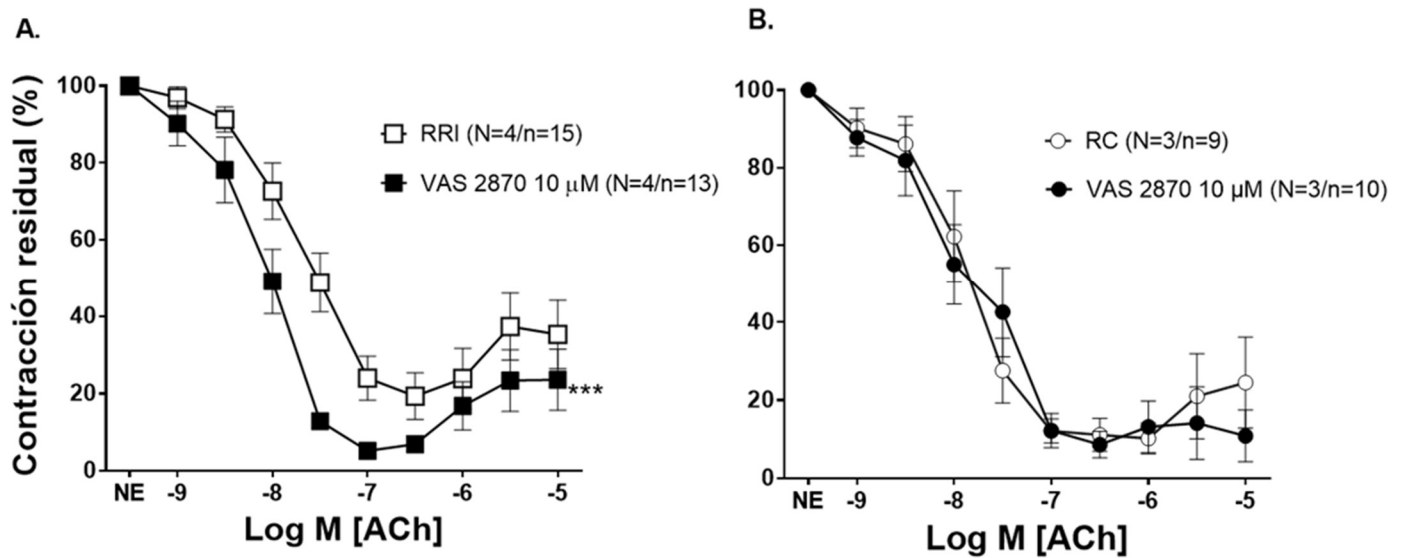


Figura 31. Efecto del inhibidor de la NADPH oxidasa, VAS 2870 (10 µM) sobre las respuestas relajadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en aortas de ratas resistentes a la insulina (RRI; panel A) y ratas control (RC; panel B). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE; 10–30 nM). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica p < 0,001 versus RRI, y * indica p < 0,05 frente a RC por un test ANOVA de dos factores.

Sin embargo, el VAS 2870 tuvo un impacto diferencial sobre las relajaciones en los segmentos arteriales de pequeño calibre. El tratamiento de las arterias mesentéricas con VAS 2870 resultó en una potenciación de la capacidad relajadora en RRI (**Figura 32A**), mientras que no tuvo efecto sobre las respuestas inducidas por ACh en RC (**Figura 32B**).



*Figura 32. Efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa con VAS 2870 (10 μM) sobre la curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos de arterias mesentéricas de ratas resistentes a la insulina (RRI; panel A) y en ratas control (RC, panel B). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE; 1-3 μM). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI mediante un test ANOVA de dos factores.*

El cofactor de la NOS no modifica las respuestas vasodilatadoras en sujetos obesos mórbidos y sí mejora la disfunción endotelial en aorta de RRI

Para testar si el desacoplamiento de la enzima NOS por déficit de cofactor podría representar una posible fuente de estrés oxidativo que resulta en una disminución en la producción de NO y un aumento en la generación de anión superóxido, los segmentos arteriales derivados de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos fueron preincubados con BH₄.

El tratamiento agudo con BH₄ (10 μM) no produjo una mejoría de las respuestas relajadoras inducidas por BK en los vasos procedentes de los sujetos OM-RI (**Figura 33A**) y tampoco modificó las respuestas en los vasos procedentes de OM-NRI (**Figura 33B**).

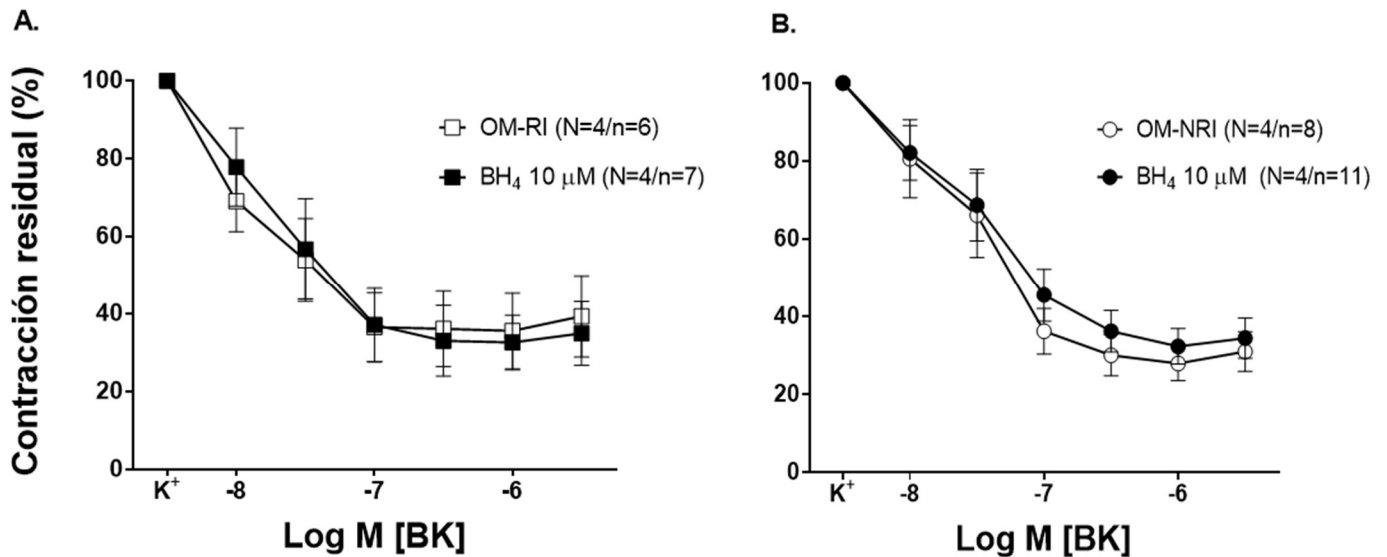


Figura 33. Efecto de la preincubación con el cofactor BH₄ (10 μM) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por bradiquinina (BK) en arterias procedentes de grasa visceral de A) sujetos obesos mórbidos con resistencia a la insulina (OM-RI) y B) sujetos obesos mórbidos sin resistencia a la insulina (OM-NRI). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de las respuestas inducidas por 25 mM K⁺. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales estudiados.

De modo similar al protocolo experimental seguido en humanos se evaluó el posible papel del desacoplamiento de la NOS en nuestro modelo de rata resistente a la insulina no obesa. El tratamiento con BH₄ mejoró notablemente las respuestas relajadoras inducidas por ACh en segmentos aórticos de RRI (**Figura 34A**). Sin embargo, en ratas control la presencia de BH₄ produjo una inhibición de la respuesta a ACh (**Figura 34B**).

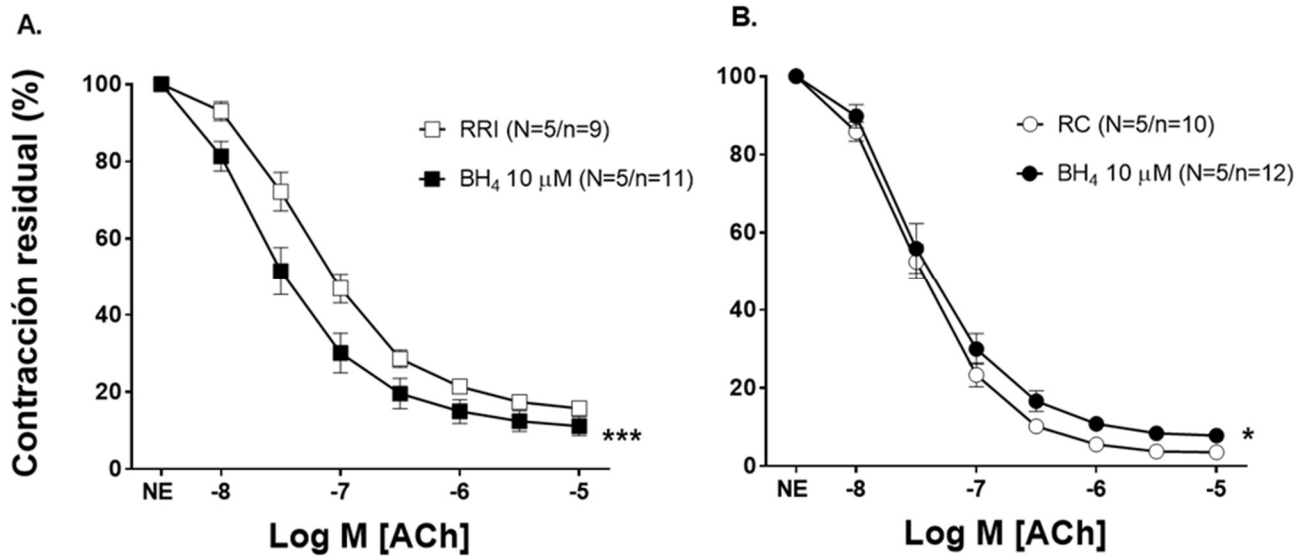


Figura 34. Efecto de la incubación con BH₄ (10 μM) sobre las relajaciones inducidas por acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratas resistentes a la insulina (RRI, panel A) y ratas control (RC, panel B) aorta de RC. Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual en respuesta norepinefrina (NE; 10–30 nM). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI (A) y * indica $p < 0,05$ frente a RC (B) mediante un test ANOVA de dos factores.

De modo similar a los resultados obtenidos en humanos, la preincubación de los segmentos arteriales procedentes del mesenterio de RRI con BH₄ no resultó en una mejoría de la relajación endotelial con respecto a los segmentos no tratados (Figura 35). Debido a la ineficacia del fármaco en arterias mesentéricas de RRI no se evaluó el efecto del BH₄ en RC.

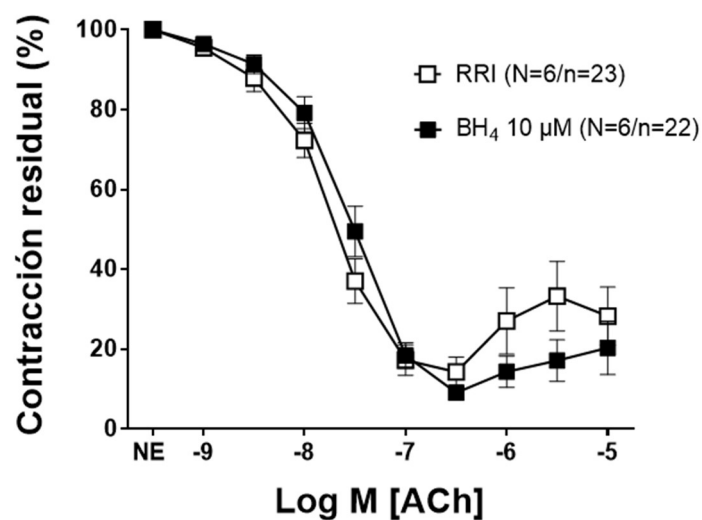


Figura 35. La preincubación con el cofactor BH₄ (10 μM) no modificó la vasodilatación inducida por acetilcolina (ACh) en arterias mesentéricas de ratas resistentes a la insulina (RRI). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta a norepinefrina (NE; 1–3 μM). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales estudiados.

Tras evaluar el papel y las potenciales fuentes de estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina, se procedió a la evaluación de la vía de L-arginina/ NO, así como las posibles estrategias farmacológicas para revertir el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes asociado a la resistencia a la insulina

Alteración de la vía L-arginina/NO en sujetos obesos mórbidos y en ratas

El incremento del sustrato de la NOS mejora la relajación endotelio-dependiente en sujetos OM-RI y en RRI.

Una disminución en la concentración o la biodisponibilidad del sustrato de la NOS, la L-arginina, ha sido estudiada como un posible mecanismo implicado en el deterioro de la relajación vascular asociada con la presencia de resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos. A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de arginina al comparar los sujetos OM-RI respecto a los sujetos OM-NRI (**Figura 36**), los estudios funcionales revelaron una posible disminución en la biodisponibilidad del sustrato asociado a la resistencia a la insulina en obesos mórbidos. Esto se confirmó mediante la preincubación de los segmentos vasculares de grasa visceral con L-arginina.

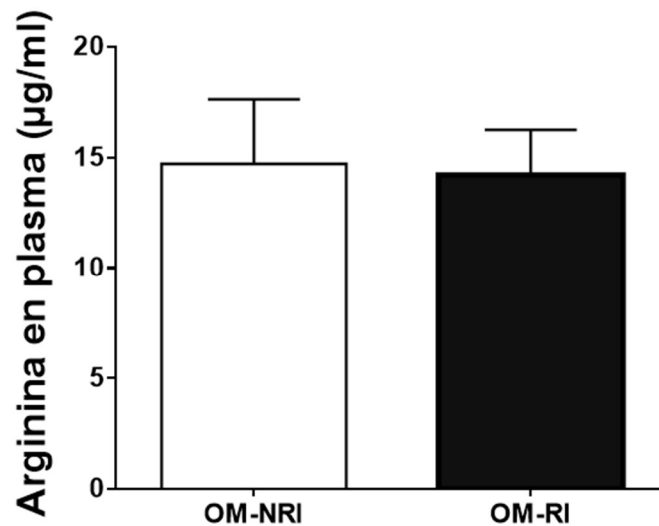


Figura 36. Concentración plasmática de arginina (µg/ml) en obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI) y en obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI). El número de sujetos estudiados fue de 17 OM-NRI y 23 OM-RI. Cada columna representa la media ± error estándar de los µg/ml de arginina.

Mientras que la preincubación de los segmentos arteriales derivados de OM-NRI (Figura 37B) con L-arginina (300 µM) no tuvo efecto sobre las respuestas vasodilatadoras a BK, en el grupo de OM-RI la L-arginina mejoró significativamente la función endotelial comprometida (Figura 37A).

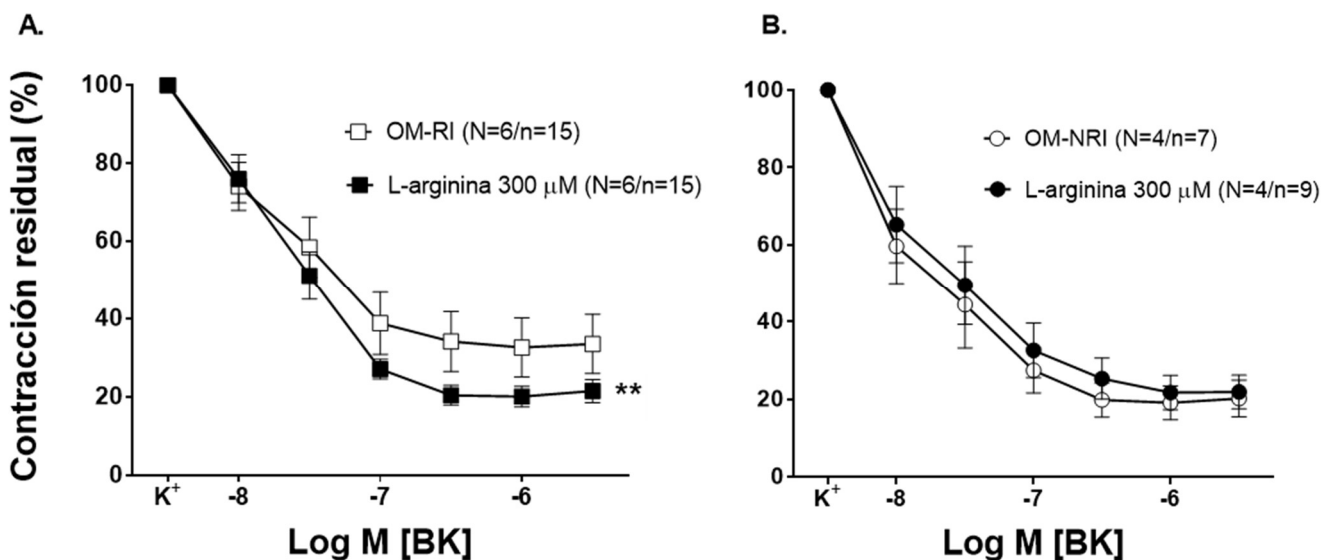


Figura 37. Efecto de L-arginina (300µM) sobre las relajaciones inducidas por bradiquinina (BK) en segmentos arteriales de obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI; panel A) y obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI; panel B). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por 25 mM. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales estudiados. ** indica $p < 0,01$ respecto a OM-RI.

De modo similar a lo observado en humanos y a pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de arginina tanto en plasma (**Figura 38A**) como en el homogenizado aórtico (**Figura 38B**) entre RRI y RC, la preincubación con L-arginina potenció significativamente la relajación a ACh en aorta (**Figura 39A**) y en microvasos mesentéricos procedentes de RRI (**Figura 40A**). Por el contrario, la L-arginina no modificó las respuestas endotelio-dependientes en RC (**Figura 39B, 40B**).

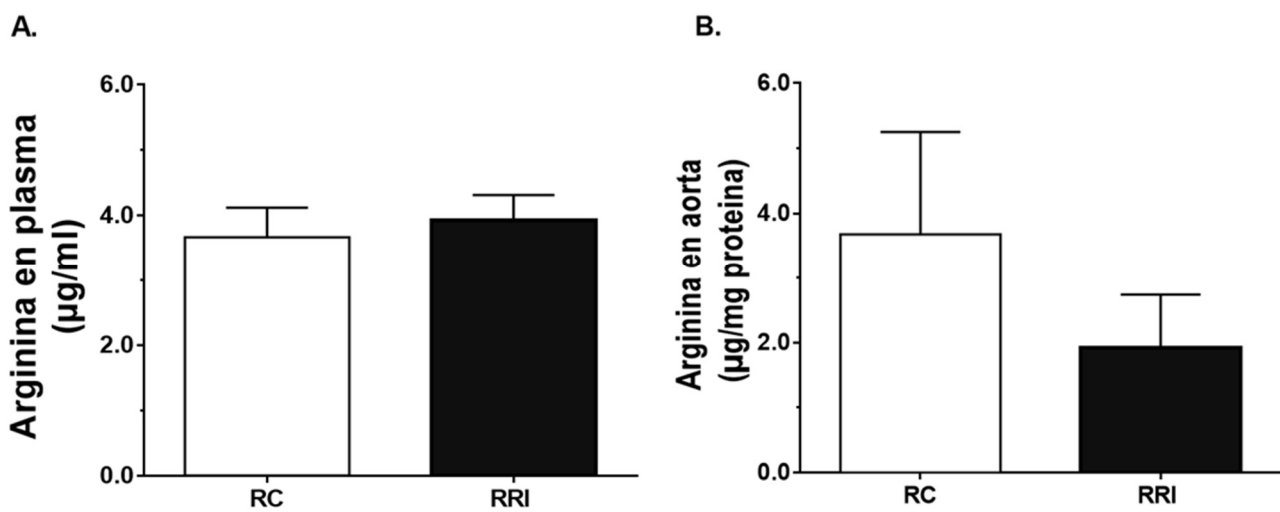


Figura 38. Concentración de arginina en plasma y en tejido aórtico obtenido de ratas control (RC) y de ratas resistentes a la insulina (RRI). Cada columna representa la media \pm error estándar de los valores de arginina medida en $\mu\text{g/ml}$ (panel A) y de los μg de arginina por mg de tejido (panel B). Los experimentos fueron realizados en 9 animales diferentes.

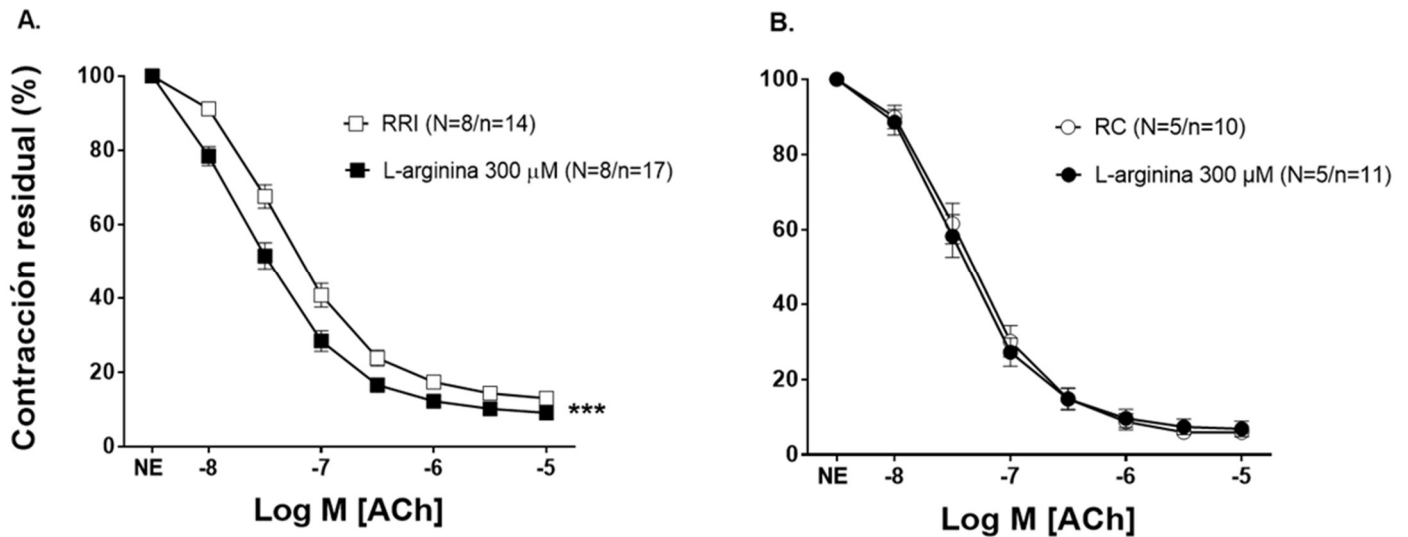


Figura 39. Efecto de la incubación con L-arginina (300 μ M) sobre las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en segmentos aórticos de ratas resistentes a la insulina (RRI; panel A) y de ratas control (RC; panel B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE; 10-30 nM). N representa el número de ratas estudiadas y n el número de segmentos arteriales utilizados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI mediante un test ANOVA de dos factores.

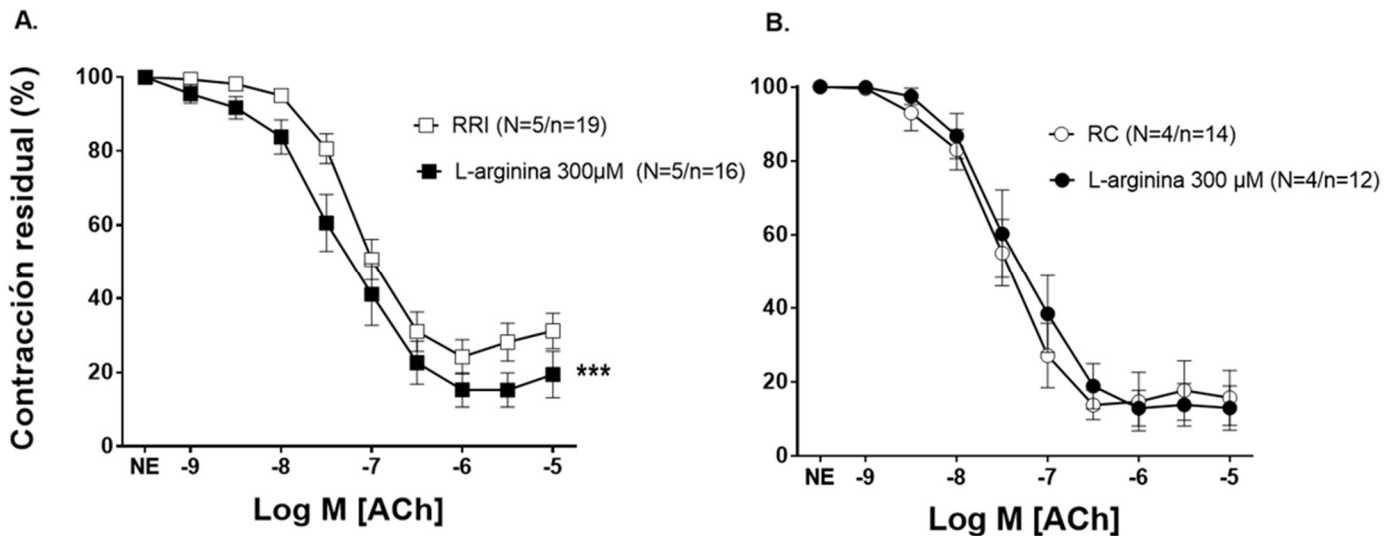


Figura 40. La adición de L-arginina (300 μ M) mejoró las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de ratas resistentes a la insulina (RRI; panel A), no teniendo efecto significativo en microvasos mesentéricos de ratas control (RC; panel B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE; 1-3 μ M). N representa el número de ratas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI mediante un test ANOVA de dos factores.

La elevación de ADMA se asocia con la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en RRI

El análisis de las concentraciones de ADMA reveló un claro aumento del ADMA, inhibidor endógeno de la NOS, tanto en suero (**Figura 41A**) como en tejido graso visceral (**Figura 41B**) procedente de obesos mórbidos resistentes a la insulina en comparación con los obesos mórbidos no resistentes a la insulina.

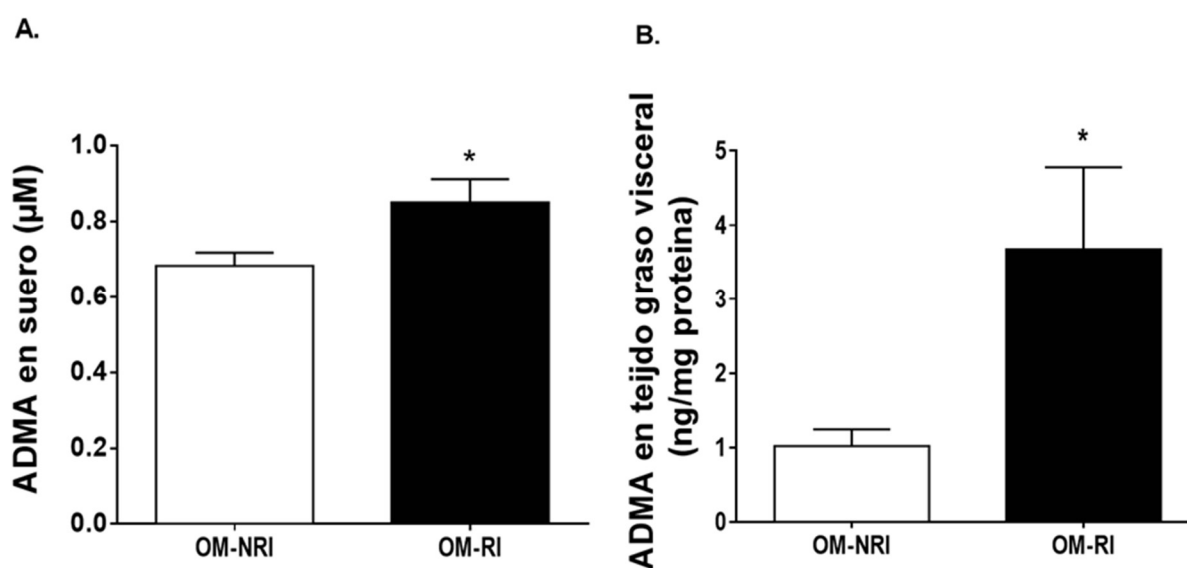


Figura 41. Concentración de ADMA en suero (A) y en tejido graso visceral (B) de obesos mórbidos sin resistencia a la insulina (OM-NRI) y obesos mórbidos resistentes a la insulina (OM-RI). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de los μ moles de ADMA (A) o de los ng de ADMA por mg de proteína de tejido (B). El número de sujetos estudiados fue 17 OM-NRI y 23 OM-RI. * indica $p < 0,05$ versus OM-NRI.

Más aún, los niveles séricos de ADMA en los sujetos obesos mórbidos mostraron una correlación positiva con el índice HOMA-IR, obteniéndose mayores valores de ADMA cuanto mayor era el índice HOMA-IR que presentaban los sujetos (**Figura 42**).

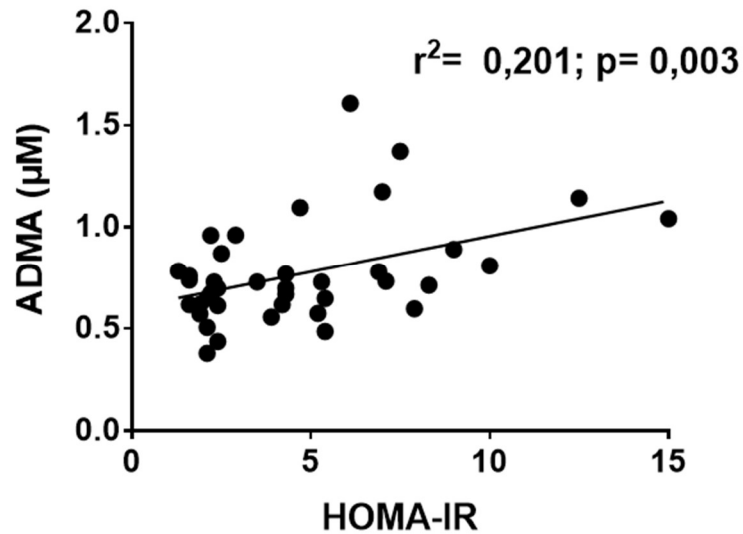


Figura 42. Correlación positiva entre los niveles de ADMA (expresados en μM) y el índice HOMA-IR en sujetos obesos mórbidos. Cada punto representa un sujeto.

Además, el análisis de la relación entre los niveles séricos de ADMA y la capacidad vasodilatadora endotelial inducida por BK representada como valores de pD2, en los sujetos obesos mórbidos mostró la existencia de una correlación inversa entre ambos parámetros (Figura 43).

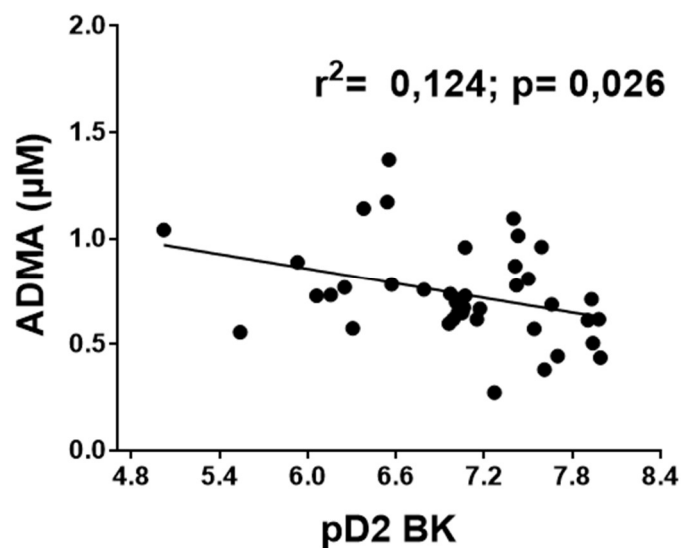
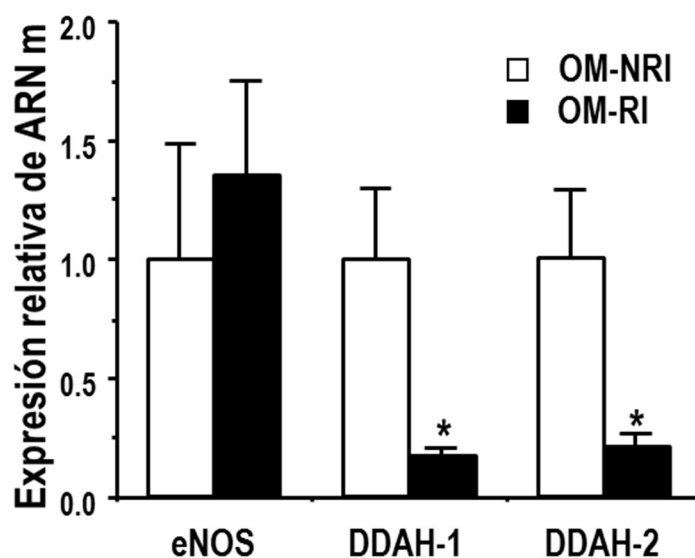


Figura 43. Correlación negativa entre los niveles séricos de ADMA (expresados en μM) y el valor de pD2 en sujetos obesos mórbidos. Cada punto representa la media de los valores de pD2 de los segmentos vasculares obtenidos de cada sujeto.

El aumento en los niveles de ADMA observado puede ser debido a una disminución en la expresión de su catabolizador endógeno (o del enzima responsable de su hidrólisis), la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH). Con el fin de testar esta hipótesis se analizó la expresión de ARNm de las dos isoformas de DDAH (DDAH1 y DDAH2) en los microvasos, observándose una reducción significativa en los niveles relativos de expresión de ambas isoformas en OM-RI con respecto al grupo no resistente a la insulina. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de eNOS entre OM-RI y OM-NRI (**Figura 44**).



*Figura 44. Expresión relativa de ARNm de eNOS, DDAH-1 y DDAH-2 en microvasos procedentes de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos. Los resultados (media \pm intervalos de confianza) se presentan como valores relativos respecto a OM-NRI. Los resultados fueron obtenidos de 4-8 pacientes diferentes. * indica $p < 0,05$ frente a OM-NRI por un test U de Mann-Whitney.*

Más aún, los niveles sistémicos y vasculares de ADMA fueron determinados en ratas para evaluar la posible interacción entre la disminución en la disponibilidad de L-arginina y el aumento del ADMA y su papel en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina. En este sentido los niveles de ADMA fueron significativamente superiores en suero (**Figura 45A**) y en homogenizado aórtico (**Figura 45B**) de RRI respecto a RC.

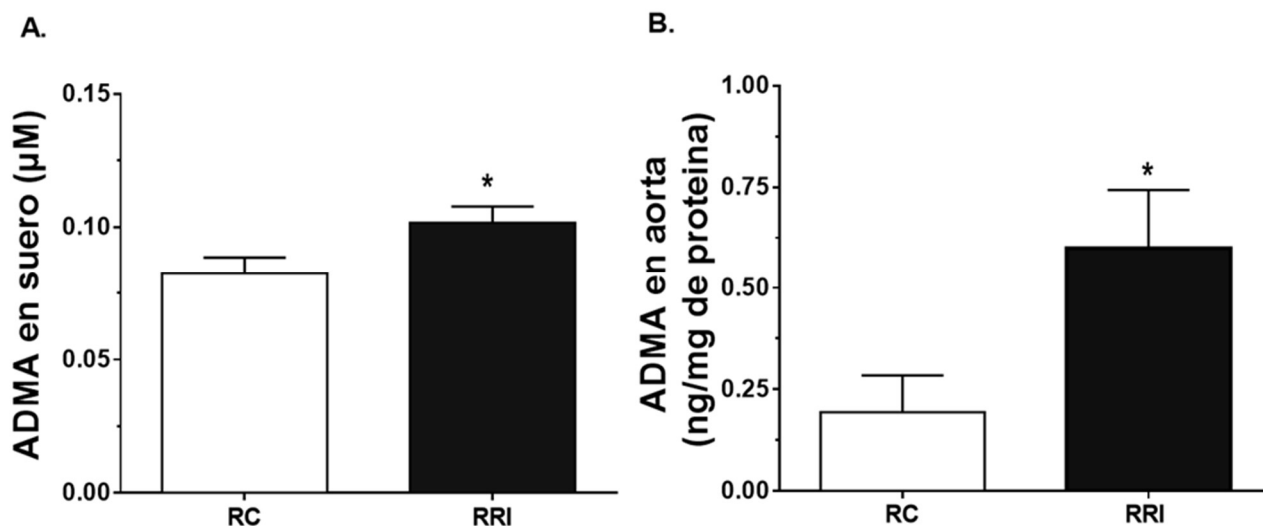


Figura 45. Elevación de los niveles de ADMA en suero (A) y en homogenizado aórtico (B) en ratas resistentes a la insulina (RRI) en comparación con las ratas control (RC). Los datos se representan como la media \pm error estándar de los μ M de ADMA (A) o de los ng de ADMA por mg de proteína del tejido. El estudio se ha realizado en siete animales diferentes. * indica $p < 0,05$ versus RC por el test de t-Student.

Además, en RRI se observó una notable disminución de los niveles de la isoforma DDAH1 en el homogeneizado aórtico en comparación con el grupo control (Figura 46). Por tanto, y en concordancia con los resultados obtenidos en humanos se confirma que la resistencia a la insulina, independientemente de la presencia de obesidad, se asocia con un aumento en los niveles de ADMA y una disminución en los niveles de DDAH1, comprometiendo la función endotelial.

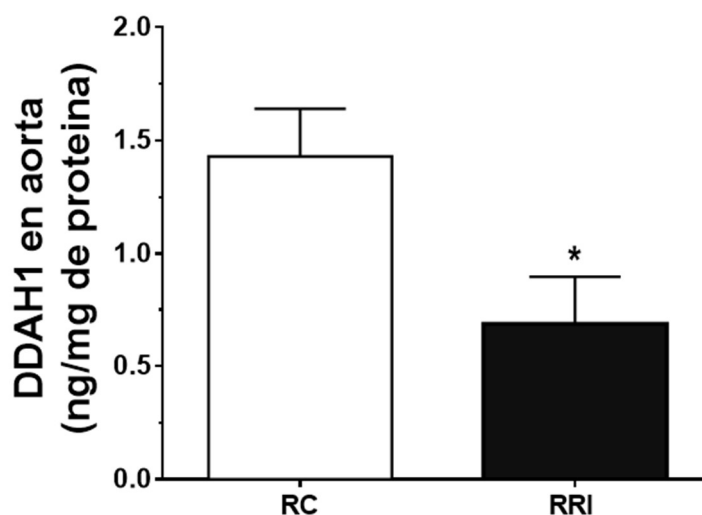
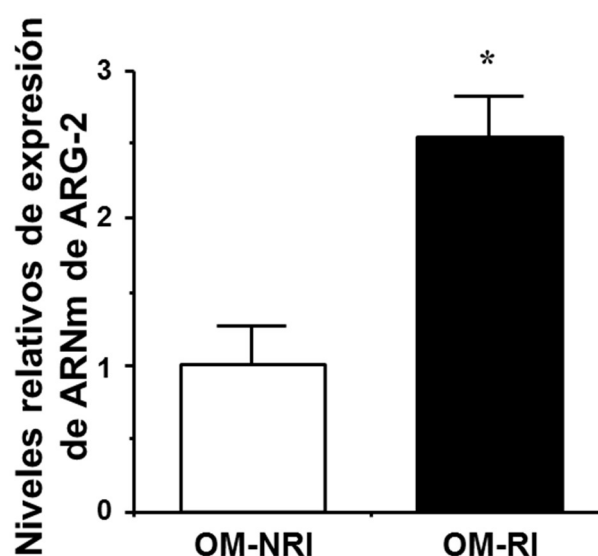


Figura 46. Disminución de los niveles de DDAH1 (medidos en ng/mg de proteína) en aorta de rata resistente a la insulina (RRI). Cada columna representa la media \pm error estándar de la media, habiéndose realizado el estudio en siete animales diferentes. * indica $p < 0,05$ versus ratas control (RC) por el test de t-Student.

El incremento de la actividad de arginasa se propone como mecanismo implicado en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en ratas.

Diferentes evidencias sugieren la contribución de la enzima arginasa a la disfunción endotelial. En los estudios de RT-PCR en tiempo real en microvasos procedentes de grasa visceral de OM-RI se ha detectado mayor expresión de ARNm de la isoforma arginasa-2 en comparación con OM-NRI (**Figura 47**).



*Figura 47. Niveles relativos de expresión de ARNm de arginasa-2 en microvasos procedentes de grasa visceral de obesos mórbidos sin resistencia a la insulina (OM-NRI) y resistentes a la insulina (OM-RI). Las arterias procedentes de grasa visceral fueron obtenidas de cinco sujetos diferentes. Cada columna representa la media \pm error estándar de la media. $p < 0,05$ versus OM-NRI está representada como * en la figura.*

La arginasa competiría con la enzima NOS por el sustrato L-arginina y, como consecuencia, podría disminuir la producción de NO, lo que, a su vez, resultaría en un empeoramiento de la relajación endotelial. Para evaluar la contribución de la arginasa al deterioro de la relajación endotelio-dependiente asociado a la resistencia a la insulina se incubaron algunos segmentos vasculares procedentes de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos con el inhibidor de la arginasa, nor-NOHA. Las vasodilataciones inducidas por BK en OM-RI fueron potenciadas por el tratamiento de los segmentos arteriales con nor-NOHA (10 μ M) (**Figura 48A**). Por el contrario, en el grupo de los

sujetos OM-NRI no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de relajación inducidas por BK de los segmentos arteriales preincubados con nor-NOHA en comparación con los segmentos no tratados con el fármaco (**Figura 48B**).

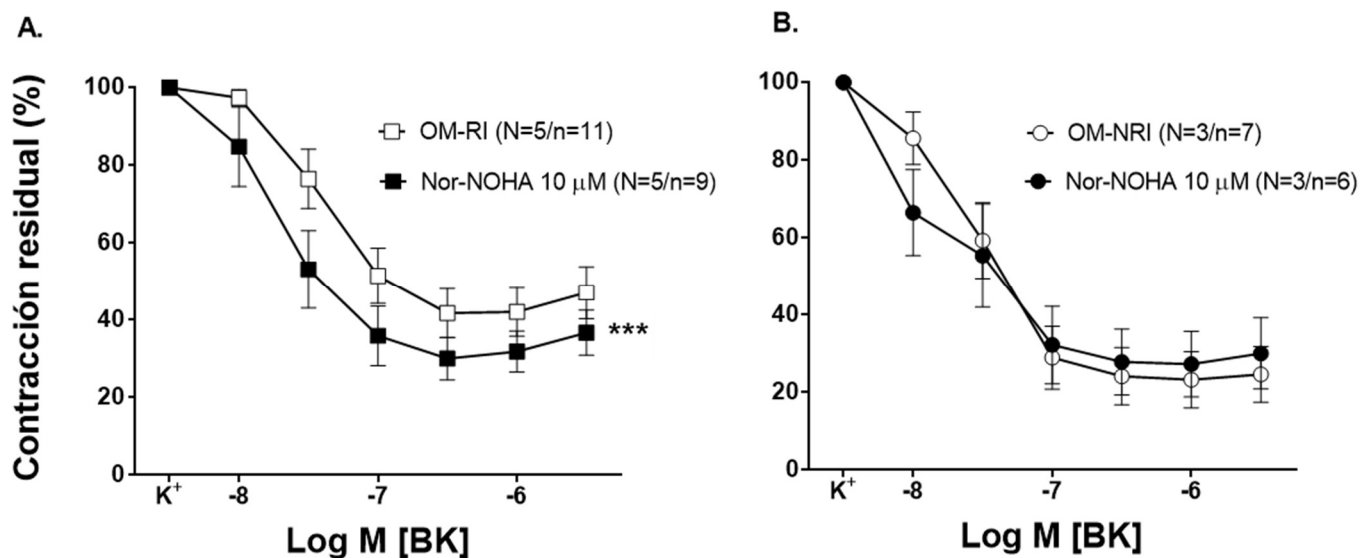
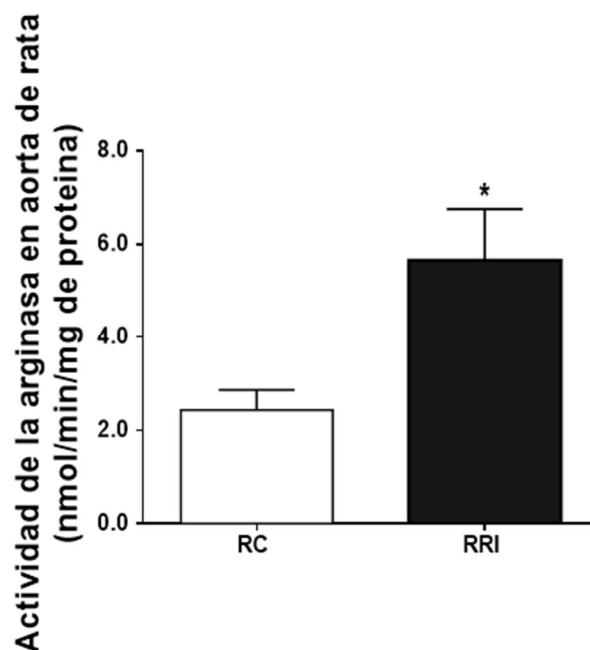


Figura 48. Efecto de la inhibición de arginasa con nor-NOHA (10 μ M) sobre la función endotelial en sujetos obesos mórbidos con resistencia a la insulina (OM-RI; panel A) y sujetos obesos mórbidos no resistentes a la insulina (OM-NRI; panel B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar del porcentaje de contracción residual de las respuestas inducidas por 25 mM K⁺. N representa el número de sujetos estudiados y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus OM-RI.

Por otro lado, estos hallazgos fueron validados en nuestro modelo animal de resistencia a la insulina. El análisis de los resultados de la determinación de la actividad de la arginasa en el homogenizado aórtico reveló un incremento significativo en la actividad de la enzima en RRI en comparación con el grupo de RC (**Figura 49**).



*Figura 49. Incremento de la actividad de arginasa en aorta de rata (medida en nmol/min/mg de proteína) en ratas resistentes a la insulina (RRI) en comparación con las ratas control (RC). El número de ratas estudiadas fue de 7 RC y 10 RRI. $P < 0,05$ versus RC está representada como * en la figura por un test de t-Student.*

Como se ha mencionado anteriormente, este incremento en la actividad de arginasa puede contribuir a la reducción de L-arginina, y por ende a la disminución en la síntesis del NO. De hecho, el tratamiento de los segmentos vasculares procedentes de RRI con nor-NOHA (10 μ M) redujo de manera significativa el deterioro de las respuestas de relajación inducidas por ACh tanto en aorta (**Figura 50A**) como en arterias mesentéricas (**Figura 51A**). Sin embargo, la preincubación con nor-NOHA no produjo efectos significativos sobre las relajaciones vasculares en ratas control, ni en aorta (**Figura 50B**), ni en microvasos mesentéricos (**Figura 51B**).

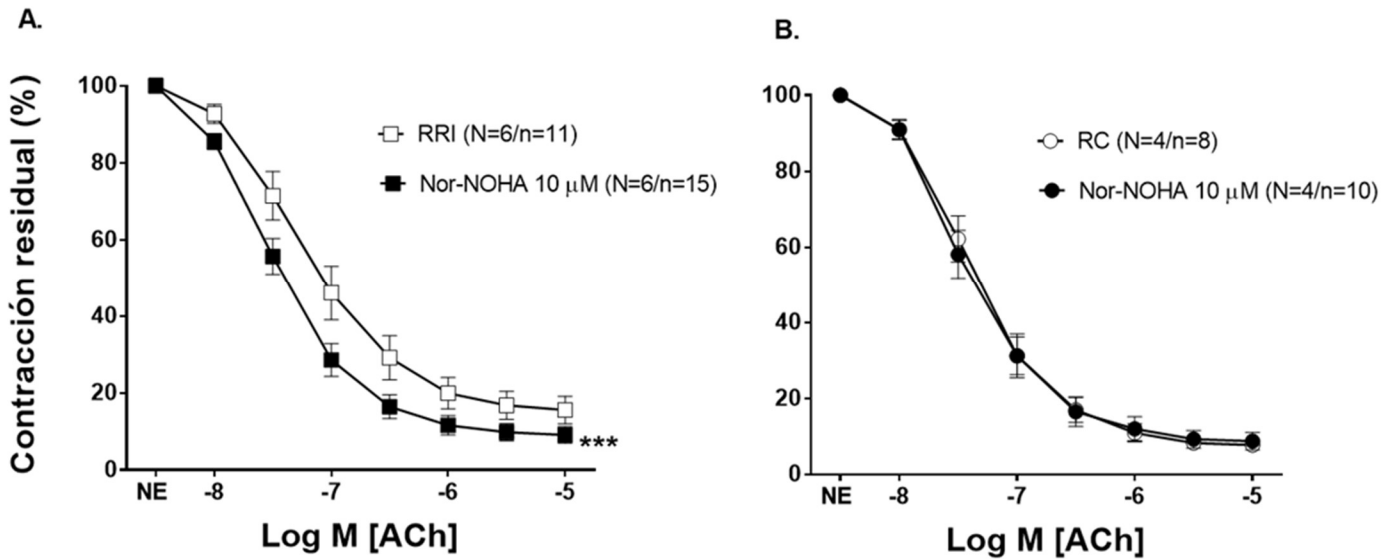


Figura 50. La inhibición de la arginasa mediante la adición de nor-NOHA 10 μM potencia la respuesta vasodilatadora inducidas por acetilcolina (ACh) en aorta de RRI (panel A), no teniendo efecto en aorta de RC (panel B). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE). N representa el número de ratas y n el número de segmentos arteriales estudiados. *** indica $p < 0,001$ versus RRI mediante un test ANOVA de dos factores.

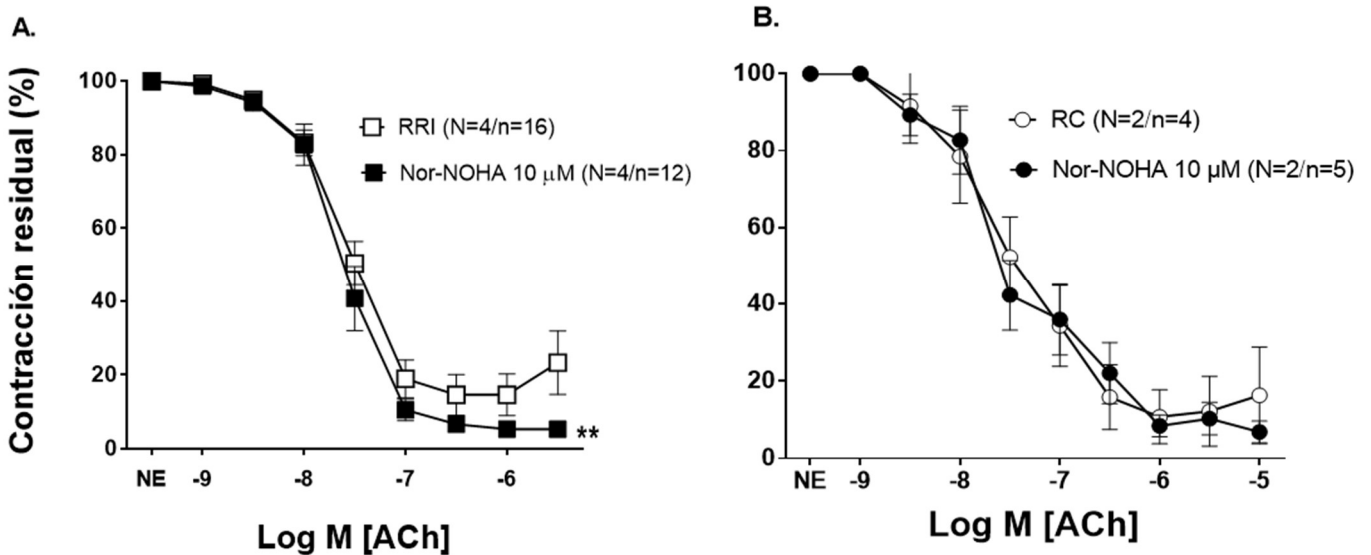


Figura 51. La inhibición de la arginasa mediante la adición de nor-NOHA 10 μM potencia la respuesta vasodilatadora inducidas por acetilcolina (ACh) en microvasos mesentéricos de RRI (panel A), no teniendo efecto en microvasos mesentéricos de RC (panel B). Los datos se expresan como la media ± error estándar del porcentaje de contracción residual de la respuesta inducida por norepinefrina (NE). N representa el número de ratas y n el número de segmentos arteriales estudiados. ** indica $p < 0,01$ versus RRI mediante un test ANOVA de dos factores.

DISCUSIÓN

La obesidad es considerada un problema epidémico a nivel mundial, tanto por su creciente magnitud como por su impacto negativo en la salud (Seidell, 2000). Más aún la obesidad, un importante factor de riesgo cardiovascular, se relaciona estrechamente con la presencia de resistencia a la insulina (Prieto et al., 2014). Esta alteración metabólica tiene un papel fundamental en el desarrollo de la disfunción endotelial que precede en años al daño estructural vascular (Landmesser & Harrison, 2001). Así, se ha propuesto que la resistencia a la insulina podría desempeñar un papel clave para explicar cómo la obesidad puede favorecer el desarrollo de la ECV y ser también el vínculo de unión entre ellas (Sorop et al., 2017).

Con el objetivo de evaluar la importancia de la resistencia a la insulina en el impacto de la obesidad sobre la vasculatura humana se ha analizado la influencia de la resistencia a la insulina sobre la función endotelial en sujetos obesos mórbidos sin ECV conocida. Para ello, se seleccionaron dos grupos de pacientes obesos mórbidos, cuya principal diferencia fue la presencia o ausencia de resistencia a la insulina determinada por el índice HOMA-IR, mientras que un grupo de sujetos sanos no obesos se empleó como grupo control. Tal y como era de esperar, los valores de glucosa e insulina fueron más elevados en el grupo de OM-RI en comparación con el grupo de OM-NRI, lo que indica la correcta clasificación de los sujetos. Estas alteraciones metabólicas se acompañaron de un deterioro marcado de las respuestas vasodilatadoras inducidas por BK en los microvasos procedentes de grasa visceral de los sujetos OM-RI en comparación con las respuestas obtenidas del grupo OM-NRI y del grupo de sujetos sanos no obesos. De hecho, la vasodilatación endotelial en el grupo de OM-NRI no se vio deteriorada respecto al grupo control. Además, se observó una significativa correlación inversa entre la resistencia a la insulina (índice HOMA-IR) y la vasodilatación endotelial (valores de pD2 para BK) en los sujetos obesos. Estos resultados sugieren que la resistencia a la insulina es un factor clave en la asociación entre la obesidad y la disfunción endotelial. Los presentes hallazgos están en consonancia con estudios previos realizados principalmente en modelos animales de obesidad en los que la resistencia a la insulina se estableció como el mediador subyacente del deterioro de la vasodilatación mediada por NO (Ali et al., 2009). Sin embargo, la mayoría de los estudios disponibles en la literatura que evalúan la disfunción endotelial asociada a la obesidad en humanos, son

estudios realizados en pacientes obesos (sin establecer diferencias entre aquellos con y sin resistencia a la insulina) comparados con sujetos sanos no obesos. Más aún, se ha propuesto la existencia de una relación entre la insulina, el índice HOMA-IR, los niveles de triglicéridos y la función endotelial (Galvao et al., 2012). De hecho, la mejoría en la función endotelial asociada a la reducción de peso se ha relacionado con una reducción en el índice HOMA-IR (Rudofsky et al., 2011).

Es importante resaltar que los valores del IMC no fueron estadísticamente diferentes entre ambos grupos de sujetos obesos mórbidos, lo que apoya el hecho de que la resistencia a la insulina es el factor determinante en la disfunción endotelial en sujetos con obesidad mórbida y no el IMC (El Assar et al., 2013; Lupattelli et al., 2013). En este sentido, una mejora de la función endotelial después de la pérdida de peso en pacientes obesos se correlacionó con la reducción en el índice HOMA-IR en lugar de con la disminución en los valores del IMC (Lupattelli et al., 2013). El papel poco relevante del IMC en la discriminación del empeoramiento metabólico entre los sujetos obesos mórbidos es apoyado por Wolf y colaboradores, donde mostraron que los sujetos extremadamente obesos no presentan mayor deterioro de su perfil metabólico en comparación con los sujetos severamente obesos (Wolf et al., 2006).

Existen evidencias clínicas que muestran una elevación de la prevalencia de diferentes patologías (la diabetes mellitus, la hipertensión, y la dislipemia) relacionadas con la presencia de obesidad que pueden contribuir al desarrollo de la aterosclerosis (Matsuda & Shimomura, 2013). Considerando este hecho, se analizó la posible influencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular en los resultados obtenidos en los sujetos de nuestro estudio. Como cabría de esperar, y teniendo en cuenta que la resistencia a la insulina desempeña un papel determinante en el desarrollo de diabetes (Kaul et al., 2015; Karalliedde & Gnudi, 2016), solo se detectó este factor de riesgo cardiovascular en los sujetos OM-RI. Sin embargo, la diabetes no parece ser la responsable de la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina ya que la exclusión de los sujetos diabéticos del grupo de los OM-RI no modificó el deterioro de las relajaciones dependientes de endotelio observado en este grupo de sujetos. Por otro lado, nuestros

resultados muestran que el grupo de los sujetos OM-RI presentan niveles inferiores de colesterol total, de HDL y de LDL en comparación con los sujetos obesos mórbidos no resistentes a la insulina, mientras que los valores de HbA_{1c} no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos evaluados. En línea con lo anterior, y aunque algunos autores han relacionado los niveles elevados de HbA_{1c} (Huang et al., 2015; Shah et al., 2015) o la alteración del perfil lipídico (Martínez-Gonzalez & Badimon, 2007; Lucero et al., 2016) con la disfunción endotelial, no se observó una correlación significativa entre los parámetros citados y la vasodilatación endotelial en los sujetos obesos estudiados. Más aún, aunque el tratamiento con hipoglucemiantes se presentaba solamente en el grupo de OM-RI y la toma de hipotensores era superior en ese grupo, no es probable que este hecho influya en el deterioro de la función endotelial detectado, ya que, por el contrario, es bien conocido el efecto potenciador de estos tratamiento sobre la vasodilatación endotelial (Taddei et al., 2002; Naka et al., 2011; Miyamoto et al., 2012).

Considerando que el sexo pudiese influenciar la función vascular y dado que el porcentaje de sujetos varones era significativamente menor en el grupo OM-NRI, se re-analizaron los datos de función endotelial eliminando los segmentos vasculares pertenecientes al sexo masculino de ambos grupos de sujetos obesos mórbidos. El hecho de que este análisis continúe revelando un deterioro de la vasodilatación endotelial en los OM-RI, confirma la idea de que el defecto en la relajación endotelial está estrechamente ligado a la presencia de resistencia a la insulina y descarta un posible sesgo debido a las diferencias en el porcentaje de sujetos de sexo masculino.

Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos donde se demuestra que los sujetos resistentes a insulina tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, incluso después del ajuste para los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (Lupattelli et al., 2013). Más aún, los resultados del Insulin Resistance and Atherosclerosis Study observaron una correlación independiente entre la resistencia a la insulina y la rigidez arterial, considerado un predictor de eventos cardiovasculares futuros (Howard et al., 1996).

Las citoquinas proinflamatorias segregadas por los adipocitos podrían jugar un papel relevante entre los mecanismos mediante los cuales la obesidad contribuiría al desarrollo de ECV. Estas adipokinas inducen una respuesta sistémica a través de la producción de reactantes de fase aguda, lo que sitúa al tejido adiposo como un mediador importante en la interacción entre la obesidad y la inflamación (Rodríguez-Hernández et al., 2013). En nuestro trabajo, la presencia de altos niveles de PCR en los sujetos obesos resistentes a la insulina refleja un estado inflamatorio crónico de bajo grado a nivel sistémico en estos sujetos. Estos resultados están en consonancia con estudios previos donde se observó un aumento en los niveles séricos de diferentes citoquinas pro-inflamatorias tales como la PCR, la IL-6, y el TNF- α en sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina respecto a los sujetos obesos mórbidos no resistentes a la insulina (El Assar et al., 2013). El empeoramiento marcado de la relajación endotelial que provocan algunas citoquinas proinflamatorias, como la IL-6 y el TNF- α , apoyan su contribución al daño endotelial (Orshal & Khalil, 2004; Myung et al., 2008). Por tanto, aunque en nuestro estudio no se encontró una correlación significativa entre los niveles séricos de PCR y la vasodilatación endotelial, no podemos descartar su posible participación en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina.

Para confirmar la importancia de la resistencia a la insulina como factor determinante en la disfunción endotelial con independencia de la obesidad, se validaron los hallazgos obtenidos en humanos en un modelo animal de resistencia a la insulina en ausencia de obesidad. Para ello, se evaluó la función vascular en ratas no obesas con resistencia a la insulina inducida por dieta rica en fructosa. Este modelo animal de resistencia a la insulina ha sido previamente caracterizado y validado (Katakam et al., 1998; L. T. Tran et al., 2009). De modo similar a lo observado en los sujetos OM-RI, las ratas tratadas con fructosa muestran hiperglucemia, hiperinsulinemia y un elevado índice HOMA-IR con respecto a las ratas control. Estas alteraciones metabólicas se acompañaron de una mermada respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente tanto en vasos de conductancia (aorta) como de resistencia (microarterias mesentéricas). Estos resultados están en consonancia con trabajos previos que revelan un deterioro de la vasodilatación endotelial en ratas tratadas con fructosa y en otros modelos animales de resistencia a la insulina (Young EJ, 2008; Chou et al., 2013; Shawky et al., 2014).

Sin embargo, el claro efecto deletéreo de la resistencia a la insulina sobre la función endotelial no se detectó en otros aspectos de la función vascular como la vasodilatación inducida directamente por la relajación del músculo liso vascular (no dependiente de endotelio). Así, las respuestas mediadas por un donador de NO no se vieron afectadas por la presencia de resistencia a la insulina ni en los sujetos obesos mórbidos ni en el modelo animal. Dada la relevancia del NO en la vasodilatación endotelial, estas evidencias indican que la posible alteración en la relajación endotelial podría deberse a una producción defectuosa o a una reducida disponibilidad del NO más que a una disminuida sensibilidad al NO a nivel del músculo liso. Otros autores encontraron resultados similares en ratas tratadas con fructosa al 10% en agua de bebida (Mahmoud et al., 2012).

Los resultados obtenidos tanto en sujetos mórbidos como en un modelo animal de resistencia a la insulina sin obesidad sugieren el papel determinante de la resistencia a la insulina en el deterioro de la vasodilatación mediada por endotelio asociado a la obesidad.

La Disfunción endotelial se asocia con el estrés oxidativo en sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina y en ratas resistentes a la insulina

Existen diversos mecanismos fisiopatológicos posiblemente implicados en las interacciones entre obesidad, resistencia a la insulina y disfunción endotelial (Grassi & Diez, 2009). En este sentido, el estrés oxidativo, y en especial el anión superóxido, juega un papel fundamental (Siti et al., 2015). Una consecuencia del aumento en la producción del anión superóxido es la disminución en la biodisponibilidad del NO, lo que resulta en una disminución de las relajaciones endotelio-dependientes como se puede observar en los resultados del presente trabajo. Así, la detoxificación del anión superóxido con el

barredor extracelular, SOD, potencia la vasodilatación endotelio-dependiente solamente en las arterias de grasa visceral procedente de los sujetos obesos mórbidos con resistencia a la acción de la insulina. Estos resultados se confirmaron en nuestro modelo animal, ya que la preincubación aguda con el barredor intracelular del anión superóxido, TEMPOL, mejoró significativamente las respuestas inducidas por ACh, que se veían deterioradas en los vasos de gran calibre (aorta) así como en los microvasos mesentéricos de ratas resistentes a la insulina. El papel del estrés oxidativo que sugieren los estudios de reactividad vascular se confirmó en los estudios de inmunofluorescencia indirecta. El presente trabajo aporta la evidencia de que la generación del anión superóxido, evaluada mediante el uso de la sonda fluorescente DHE, es más acusada en los cortes histológicos de los sujetos OM-RI en comparación con el grupo de OM-NRI y el grupo control no obeso. Además, nuestros resultados muestran una correlación inversa entre el porcentaje de núcleos teñidos y el valor de pD2 en respuesta a BK, lo que sugiere una relación entre el aumento de estrés oxidativo y el deterioro de la función vascular asociada a la resistencia a la insulina. Este hecho está respaldado por trabajos previos donde se ha demostrado la implicación del estrés oxidativo en la disfunción endotelial asociada a la obesidad tanto en humanos como en modelos animales de obesidad y de resistencia a la insulina. En este sentido, Viridis y cols., mostraron un aumento de la generación del anión superóxido en la pared vascular de los segmentos procedentes del espécimen de grasa visceral de sujetos obesos mórbidos en comparación con los sujetos no obesos y una normalización de las respuestas deterioradas inducidas por ACh en presencia de TEMPOL (Viridis et al., 2011). Un efecto potenciador de SOD sobre la relajación endotelio-dependiente deteriorada en aorta (Kobayasi et al., 2010) y microvasos (Kobayasi et al., 2010; Lobato et al., 2011) de animales obesos también ha sido descrita. Sin embargo, cabe destacar que estos estudios no establecen diferencias basadas en la presencia o ausencia de la resistencia a la insulina.

Existen diferentes fuentes de estrés oxidativo que pueden contribuir a la generación vascular del anión superóxido asociado a la resistencia a la insulina o a la obesidad. En este sentido, la mitocondria parece jugar un papel fundamental en la fisiopatología del daño vascular relacionado con la diabetes, la resistencia a la insulina (Sivitz & Yorek,

2010; Jeong et al., 2016) y la obesidad (Pung et al., 2012; Mao et al., 2017). De hecho, existen evidencias que establecen la mitocondria como fuente primaria de estrés oxidativo y muestran la producción del anión superóxido de origen mitocondrial como una característica común de diferentes modelos de resistencia a la insulina en adipocitos (Hoehn et al., 2009). Estas premisas hacen pensar que, una depuración del anión superóxido a nivel mitocondrial tendría efectos beneficiosos sobre la función vascular. En línea con lo anterior, la mitoTEMPO se ha descrito como un potente fármaco con capacidad para disminuir el anión superóxido mitocondrial y el celular, reducir la actividad de la NADPH oxidasa celular y restaurar el nivel de NO biodisponible, mejorando así la función endotelial (Dikalova et al., 2010).

La idea del papel determinante del estrés oxidativo de origen mitocondrial en la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina se ve apoyada por el efecto potenciador del mitoTEMPO sobre las deterioradas relajaciones endotelio-dependientes en los microvasos de sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina y en los segmentos aórticos procedentes de ratas tratadas con fructosa. Estos resultados están en consonancia con trabajos previos donde se ha descrito la implicación del estrés oxidativo mitocondrial en la fisiopatología del daño vascular asociado a diabetes y a resistencia a la insulina (Bonnard et al., 2008; Sivitz & Yorek, 2010; Jeong et al., 2016). Sin embargo, la reducción del estrés oxidativo de origen mitocondrial deterioró la relajación inducida por ACh en los segmentos aórticos procedentes de las RC. Este hecho puede deberse al importante papel descrito de las ROS como moléculas de señalización que regulan un amplio número de procesos celulares (Ristow, 2014), por tanto, su eliminación podría no resultar beneficiosa en condiciones fisiológicas no asociadas a patologías. Por otro lado, nuestros resultados muestran también la ausencia de efecto del mitoTEMPO sobre la función endotelial en microvasos mesentéricos de RRI. Además, las evidencias visuales de la inmunodetección del anión superóxido en cortes de arterias procedentes de la grasa visceral de obesos mórbidos, muestran una disminución en el número de núcleos con marcaje positivo para la sonda DHE en los segmentos tratados con mitoTEMPO. Estos resultados, respaldan los hallazgos obtenidos en los estudios de reactividad vascular reforzando la idea de que el estrés oxidativo de origen mitocondrial deteriora la función endotelial en presencia de resistencia a la insulina, al menos en

sujetos obesos mórbidos y en aorta de ratas. Nuestros resultados están en concordancia con un estudio realizado en un modelo animal de obesidad (ratas *Zucker* obesas), donde se observaron niveles aumentados de ROS en células de endotelio aórtico y de músculo liso en comparación con las ratas no obesas. El tratamiento con mitoTEMPO disminuyó notablemente los niveles de ROS (Pung et al., 2012). Además de los estudios relacionados con obesidad, existe también evidencia científica que asocia la resistencia a la insulina con la disfunción mitocondrial (Mootha et al., 2003; Patti et al., 2003).

Por otro lado se ha descrito que el deterioro en la función endotelial en ratas resistentes a la insulina (El Assar et al., 2015a; El Assar et al., 2015b), así como en sujetos obesos (La Favor et al., 2016), puede ser también debido a un aumento del estrés oxidativo asociado a la actividad de la NADPH oxidasa. Otros estudios en ratones obesos muestran la implicación del tejido adiposo en la disfunción endotelial a través de mecanismos que están ligados al aumento del estrés oxidativo derivado de la NADPH oxidasa y de la producción de citoquinas proinflamatorias (Ketonen et al., 2010b). La inhibición de la NADPH podría ser, por tanto, considerada como otra estrategia farmacológica para paliar la enfermedad vascular asociada a la resistencia a la insulina (Sukumar et al., 2013).

En un estudio reciente realizado en sujetos obesos mórbidos se observó un aumento de la generación de anión superóxido vascular, producido en parte, por la NADPH oxidasa. Además, la inhibición de esta fuente de estrés oxidativo con apocinina mejoró de manera marcada el deterioro de relajación endotelio dependiente en arterias mesentéricas procedentes de sujetos obesos mórbidos (Viridis et al., 2011). Sin embargo, la falta de efecto del VAS2870, inhibidor de la NADPH oxidasa, sobre las respuestas inducidas por BK, descarta el posible papel de la NADPH oxidasa en la reducción de la biodisponibilidad del NO asociado a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos, tal y como se observa en nuestro estudio. Una vez más, es importante resaltar que en este estudio y, a diferencia de los estudios disponibles en la literatura, se evalúan las diferencias entre aquellos sujetos OM con y sin resistencia a la insulina. Aunque algún estudio sugiere que el VAS 2870 posee actividad en otras dianas farmacológicas a parte

de su principal acción como inhibidor de la NADPH oxidasa (Sun et al., 2012), la mayoría de las publicaciones describen el VAS 2870 como un potente antioxidante capaz de inhibir la actividad de la NADPH oxidasa (Nikiforova et al., 2013). La evaluación del posible papel de la NADPH oxidasas en nuestro modelo animal de resistencia a la insulina mostró que la preincubación con VAS 2870 no solo no mejoró las relajaciones de los segmentos aórticos de RRI, incluso las empeoró al igual que en RC. Por el contrario, el inhibidor de la NADPH oxidasa si potenció significativamente las relajaciones inducidas por ACh en las arterias mesentéricas procedentes de RRI. Nuestros resultados en animales están en consonancia con trabajos previos realizados en un modelo animal de resistencia a la insulina donde se observó una mejoría en la vasodilatación inducida por ACh en arterias mesentéricas de ratas resistentes a la insulina preincubadas con VAS 2870 (El Assar et al., 2015a). Además, también se ha demostrado que la inhibición de la NADPH oxidasa potencia notablemente la relajación endotelial en ratones resistentes a la insulina (Sukumar et al., 2013).

Por último, el desacoplamiento de la enzima NOS se ha descrito como otra fuente potencial de anión superóxido en las células del endotelio microvascular (Bever et al., 2006). La deficiencia de BH₄, cofactor de la NOS, entorpece el correcto acoplamiento de la enzima que se traduce en un aumento de generación de anión superóxido y una menor síntesis de NO (Shinozaki et al., 1999; Vasquez-Vivar et al., 2003; Moens et al., 2008). Los presentes resultados muestran que la adición de BH₄ no tuvo efecto sobre la relajación endotelial de los microvasos procedentes de los sujetos obesos mórbidos ni en los microvasos mesentéricos de las ratas con resistencia a la insulina. Por el contrario, se observó una mejoría en la relajación mediada por endotelio en los segmentos de aorta de ratas resistentes a la insulina en presencia de BH₄. Estos últimos resultados positivos en la aorta están en consonancia con otros estudios realizados en arteriolas de ratas tratadas con una elevada concentración de glucosa en su alimentación donde la adición de BH₄ mejoró la vasodilatación dependiente de NO (Bagi et al., 2004). De modo similar, se ha observado una alteración en el equilibrio entre el óxido nítrico derivado del endotelio y la formación de anión superóxido, y por consiguiente un empeoramiento de la vasodilatación dependiente del endotelio en respuesta a ACh, que fue mejorada

gracias al tratamiento de los segmentos vasculares de ratones obesos con un precursor de BH₄ (Ketonen et al., 2010a). Las divergencias encontradas entre los distintos lechos vasculares evaluados en el presente trabajo (micro y macrovasos) en relación a los principales sistemas generadores de estrés oxidativo implicados en la aparición del daño vascular asociado a la resistencia a la insulina, pueden ser debidas a la participación de diferentes procesos fisiológicos en la respuesta vasodilatadora a lo largo del árbol arterial y, por tanto, la misma situación patológica puede generar alteraciones diversas, y de ahí la importancia de la visión holística del sistema cardiovascular a la hora de establecer dianas terapéuticas específicas.

La alteración de la vía de L-arginina/ NO contribuye al deterioro de la vasodilatación endotelial asociada a la resistencia a la insulina

Además del estrés oxidativo, otros mecanismos pueden reducir la disponibilidad del NO (Kraehling & Sessa, 2017), considerado un mediador clave en la relajación endotelial (Forstermann & Sessa, 2012). De hecho, se ha descrito que la reducción del NO derivado del endotelio tiene como consecuencia un fenotipo vascular más propenso a la aterogénesis (Cayette et al., 1994). Estudios en ratas obesas han demostrado que el desarrollo de disfunción endotelial en diferentes lechos vasculares se asociaba con una reducción en la concentración de NO y un incremento del estrés oxidativo vascular (Zanchi et al., 1995).

Aunque el proceso de disfunción endotelial puede ser explicado fundamentalmente por una disminución en la biodisponibilidad del NO, el origen de esta disfunción es múltiple (Ali et al., 2009). Así, se ha descrito que el ADMA inhibe la NOS y como resultado reduce la producción de NO, lo que conllevaría a una disminución en las relajaciones endotelio-dependientes (Vallance et al., 1992b). Aunque estudios previos han demostrado la presencia de concentraciones más elevadas de ADMA en sujetos obesos en comparación con los sujetos con normopeso (Siervo & Bluck, 2012) y en sujetos con

resistencia a la insulina (Toutouzas et al., 2008), sin embargo, los resultados que relacionan el ADMA, el NO y el HOMA-IR son controvertidos. En este sentido, algunos autores muestran niveles más elevados de ADMA en sujetos OM-RI en comparación con los OM-NRI (McLaughlin et al., 2006). Es más, una mejoría en la sensibilidad a la insulina mediante intervención farmacológica se asocia a una reducción de los niveles de ADMA (Asagami et al., 2002; Stuhlinger et al., 2002; Hsu et al., 2014). Otros estudios no encontraron una relación entre los niveles de ADMA y el índice de HOMA-IR en sujetos obesos. En este sentido, y a pesar de que los sujetos obesos presentaban valores elevados de HOMA-IR en comparación con el grupo control, los niveles séricos de ADMA no fueron diferentes entre ambos grupos estudiados (Tanrikulu-Kucuk et al., 2015). Resultados similares se observaron en pacientes con síndrome de ovario poliquístico (Pamuk et al., 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos en la presente tesis apoyan la existencia de una asociación entre la resistencia a la insulina y la elevación de los niveles de ADMA. Así lo sugiere la evidencia de que la concentración de ADMA está aumentada en presencia de resistencia a la insulina, tanto a nivel sistémico (evaluado en suero de humanos y de ratas) como a nivel local (evaluado en el homogeneizado de grasa visceral humano y en el homogeneizado aórtico de las ratas). Además, se encontró una correlación positiva entre el ADMA y el índice HOMA-IR. Es más, la correlación negativa detectada entre los niveles de ADMA y los valores de pD2 para BK sugieren la existencia de una clara asociación entre los niveles endógenos elevados del ADMA y la disfunción endotelial en el contexto de la resistencia a la insulina. Esta correlación inversa entre los valores de ADMA y la capacidad vasodilatadora apoya el concepto de que la acumulación de ADMA se relaciona con la disfunción endotelial y tiene importancia como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Magne et al., 2015). En relación con lo mencionado, existe evidencia de que la terapia intensiva con insulina reduce las concentraciones plasmáticas de ADMA en pacientes críticos (Siroen et al., 2005) y tal efecto podría explicar el impacto positivo de la terapia intensiva de insulina sobre la función endotelial en estos pacientes (Langouche et al., 2005).

En el organismo, la degradación del ADMA ocurre principalmente por la acción de la enzima DDAH, capaz de metabolizar el ADMA en citrulina y dimetilamina (Pope et al.,

2009). Por tanto, la actividad de la DDAH es un modulador clave del contenido endógeno de ADMA (Siroen et al., 2006; Arrigoni et al., 2010). Este hecho, nos condujo a evaluar la expresión génica de las dos isoformas de la DDAH (DDAH-1 y DDAH-2). Los resultados de los experimentos de PCR en tiempo real mostraron una disminución significativa en los niveles relativos de expresión de ARNm de ambas isoformas en el homogenizado arterial de los especímenes de grasa visceral procedente de los sujetos OM-RI en comparación con el grupo de OM-NRI. Más aún, el contenido aórtico de la isoforma predominante en el metabolismo del ADMA a nivel vascular, la DDAH1 (Sydow et al., 2008; Hu et al., 2009), estaba disminuido en RRI en comparación con las ratas control. Estos resultados sugieren que la elevación de los niveles de ADMA asociada a la resistencia a la insulina podría ser debida, en parte, a una disminución del contenido de su metabolizador endógeno, la DDAH. Nuestros resultados están en consonancia con los datos obtenidos por Chen y colaboradores (2012), en cuyo estudio se observó una disminución marcada en la actividad de la enzima DDAH y en la expresión aórtica de la isoforma DDAH-1 junto con un incremento en los niveles plasmáticos de ADMA en ratas resistentes a la insulina sometidas a una dieta rica en grasa durante 8 semanas (Chen et al., 2012). En otro trabajo, realizado en ratones sometidos a una dieta rica en grasa y con una sobreexpresión de la isoforma DDAH-2 inducida genéticamente, se encontraron niveles más bajos de glucosa en plasma y mayores niveles de insulina comparados con los ratones de tipo salvaje (Hasegawa et al., 2013). Todo esto sugiere que la acumulación del ADMA asociada a la resistencia a la insulina puede ser debida a la disminución en la expresión y/o actividad de la enzima DDAH (Lai & Ghebremariam, 2016).

Otro mecanismo propuesto para explicar la alteración de la vía del NO asociado a la resistencia a la insulina y/o a la obesidad, es la disminución de la disponibilidad de la L-arginina, sustrato de la eNOS. La depleción de L-arginina se ha relacionado con una reducción competitiva de la síntesis de NO mediada por la NOS (Luiking et al., 2012). Además se ha descrito que la administración de arginina tiene un efecto beneficioso sobre la disfunción endotelial con independencia de la captación celular de arginina (Nesher et al., 2014). En un estudio reciente realizado en adultos sanos con sobrepeso y factores de riesgo para desarrollar ECV se observó que la suplementación con dosis bajas de L-arginina alivió la disfunción endotelial postprandial, cuando la concentración basal

de arginina plasmática era relativamente baja (Deveaux et al., 2016). En otro trabajo realizado en ratas resistentes a la insulina (sometidas a una dieta rica en grasa) se ha demostrado que la suplementación de L-arginina modula los biomarcadores de disfunción endotelial (previniendo una disminución del estado antioxidante y evitando un aumento en el índice HOMA-IR, de LDL y de los triglicéridos), teniendo por tanto una actividad anti-aterogénica (Bogdanski et al., 2015). Los resultados de la presente tesis no revelaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de L-arginina en presencia o ausencia de la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos. Este hallazgo se confirmó en nuestro modelo animal. De hecho, no se observó una disminución en la concentración plasmática de arginina y tampoco en el contenido de este aminoácido en el tejido aórtico de RRI en comparación con las RC. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la adición aguda de L-arginina mejoró significativamente el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes asociado a la RI en todos los lechos vasculares estudiados (arterias de grasa visceral humana, así como arterias mesentéricas y aorta de rata). Esta confirmación del efecto positivo del tratamiento con L-arginina sobre la función endotelial, junto con el hecho de la no existencia de una depleción de L-arginina basal, sugiere que una reducción en la biodisponibilidad de L-arginina para la síntesis de NO contribuiría a la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina. Este hecho tiene relevancia clínica ya que estudios previos han mostrado que los niveles reducidos de L-arginina aumentan el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular o cerebrovascular y, como consecuencia, aumentan el riesgo de mortalidad (Tang et al., 2009; Bersani et al., 2016; Karlsson et al., 2017).

Otro de los mecanismos que podría constituir una posible explicación para la reducción de la disponibilidad de L-arginina en presencia de resistencia a la insulina y/o obesidad es el aumento en la actividad y/o expresión de la arginasa, enzima capaz de metabolizar la L-arginina en ornitina y urea, limitando la disponibilidad del sustrato para la síntesis de NO (Dioguardi, 2011). Este hecho impactaría negativamente sobre la función endotelial. Nuestros resultados muestran una mayor actividad de arginasa en el homogenizado aórtico de ratas resistentes a la insulina con respecto a las ratas control. Más aún, en este trabajo se describe por primera vez un aumento de los niveles relativos

de expresión de ARNm de la isoforma arginasa-2 en el homogenizado arterial de los especímenes de grasa visceral procedente de los OM-RI en comparación con los sujetos OM-NRI. Estos hallazgos, junto con el hecho de no observar diferencias notables en la concentración de L-arginina en presencia de la resistencia a la insulina, apoyan la hipótesis que relaciona la resistencia a la insulina con una disminución en la disponibilidad del sustrato. Nuestros resultados están en concordancia con anteriores estudios, que han demostrado un aumento en la expresión y actividad de la arginasa-2 en aorta de ratones obesos (Yi Yu et al., 2014). Además, en sujetos diabéticos tipo 2 se ha descrito un aumento de la actividad de la arginasa plasmática (Kashyap et al., 2008), así como en aorta de ratas tratadas con fructosa en agua de bebida (El-Bassossy et al., 2013). Más aún, la ausencia de cambios significativos en la expresión de ARNm de la eNOS en el homogenizado arterial entre ambos grupos de sujetos obesos mórbidos, sugiere que la resistencia a la insulina tiene un efecto diferencial sobre las enzimas responsables de metabolizar la L-arginina. Nuestros resultados están en consonancia con otros estudios en ratas que han demostrado que la expresión de la eNOS no se ve afectada por la obesidad ni por la resistencia a la insulina (Fulton et al., 2004; Bouvet et al., 2007).

Respecto a la arginasa se ha descrito que una inhibición de la enzima supone, según algunos autores, la prevención del deterioro de la síntesis de NO y la inhibición de la superproducción de ROS en el síndrome metabólico, reduciendo la hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia y mejorando por tanto la relajación endotelial dependiente de NO (El-Bassossy et al., 2013; Rabelo et al., 2015; Nguyen et al., 2016). De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con un inhibidor de la arginasa (nor-NOHA) mejoró la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina en microvasos de sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina y en aortas y microvasos mesentéricos de ratas resistentes a la insulina. Apoyando esta idea, la inhibición de la arginasa con nor-NOHA se ha mostrado capaz de favorecer la restauración de la función endotelial deteriorada en ratones obesos, lo que indica que el tratamiento con inhibidores de la arginasa podría representar una diana terapéutica para paliar la disfunción endotelial vascular en sujetos obesos (Chung et al., 2014). Por tanto, nuestros resultados respaldan la hipótesis de que un aumento en la expresión o

la actividad de arginasa juega un papel fundamental comprometiendo la biodisponibilidad de la L-arginina para la NOS, lo que tiene, como consecuencia, un impacto sobre la función endotelial que podría ser aliviada/paliada por inhibidores de la arginasa.

En resumen, nuestros resultados revelan el papel determinante de la resistencia a la insulina sobre la función endotelial e identifican la presencia de estrés oxidativo y la alteración de la vía L-arginina/NO como mecanismos implicados en el deterioro de la función vascular causada por la presencia de la resistencia a la insulina en los vasos de sujetos obesos mórbidos y en un modelo animal (**Figura 52**). La caracterización de estos mecanismos permite establecer potenciales objetivos terapéuticos de intervención para paliar la disfunción endotelial y, por tanto, retrasar la aparición de sus consecuencias, como la enfermedad cardiovascular. Por último, cabe destacar la importancia de realizar la confirmación en tejido vascular humano de las evidencias obtenidas en el modelo animal, ya que las alteraciones no siempre son extrapolables, aunque sean lechos vasculares análogos, como sugieren los hallazgos del presente estudio.

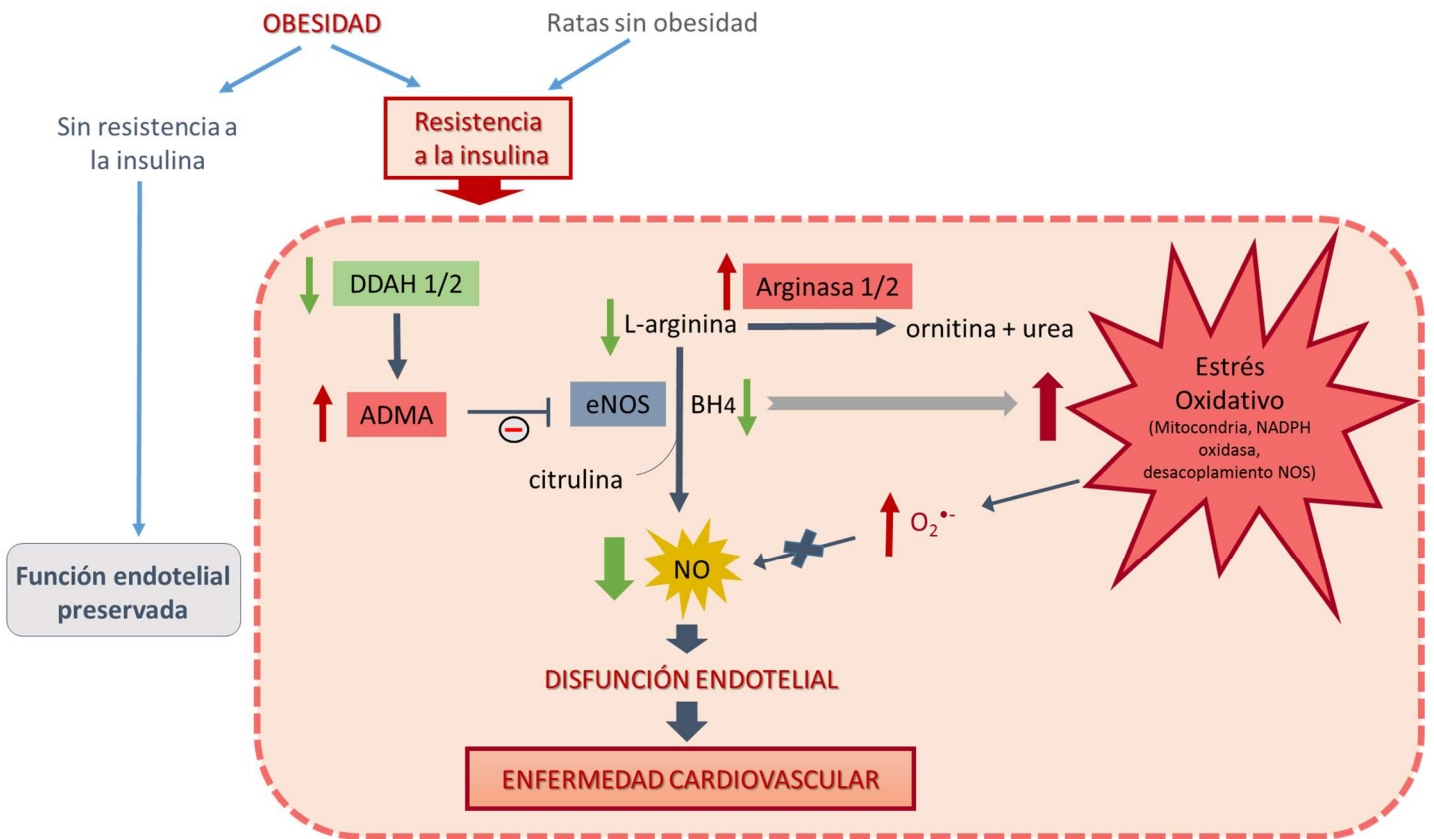


Figura 52. Representación esquemática de los principales mecanismos involucrados en el deterioro de la función endotelial asociado a la resistencia a la insulina en sujetos obesos mórbidos y en un modelo animal de resistencia a la insulina.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo son las siguientes:

1. La resistencia a la insulina juega un papel determinante en el deterioro de las relajaciones endotelio-dependientes en sujetos obesos mórbidos y en un modelo de rata resistente a la insulina sin obesidad.
2. Este defecto en la relajación puede explicarse por el aumento de estrés oxidativo, en especial por un aumento del anión superóxido en la pared vascular, que compromete la disponibilidad del NO.
3. El estrés oxidativo de origen mitocondrial deteriora la función endotelial en microvasos de sujetos OM-RI y en aorta de RRI. El tratamiento con mitoTEMPO potencia la vasodilatación comprometida en ambos modelos experimentales y disminuye la producción de anión superóxido en la pared arterial de los sujetos OM-RI.
4. Mientras que la NADPH oxidasa no parece ser uno de los sistemas responsables de la generación de anión superóxido en los microvasos de sujetos OM-RI, esta fuente sí que contribuye al aumento de estrés oxidativo en arterias mesentéricas de RRI y su inhibición mejora la vasodilatación dependiente de endotelio.
5. El desacoplamiento de la NOS por déficit de cofactor participa en el deterioro de las relajaciones endotelio-dependiente asociado a la resistencia a la insulina en aorta de rata.
6. El incremento del ADMA a nivel sistémico y/o vascular y la disminución en la expresión de la enzima DDAH-1 es uno de los mecanismos subyacentes en la alteración de la vía de la L-arginina/ NO asociada a la resistencia a la insulina tanto en vasos humanos como de rata.
7. El tratamiento agudo con L-arginina de los segmentos vasculares mejora la relajación endotelial tanto en humanos obesos mórbidos resistentes a la insulina como en ratas resistentes a la insulina, probablemente por aumento de la disponibilidad de L-arginina.

8. La expresión de la isoforma arginasa-1 está aumentada en sujetos obesos mórbidos resistentes a la insulina y contribuye a la disfunción endotelial. El tratamiento agudo con nor-NOHA, inhibidor de la arginasa, potencia la relajación endotelial. Estos resultados se confirman en ratas resistentes a la insulina, no obesas.
9. La modulación farmacológica de las vías de estrés oxidativo y de L-arginina/NO podría constituir una estrategia para aliviar/paliar la disfunción endotelial asociada a la resistencia a la insulina y, por tanto, prevenir o retrasar la aparición de enfermedad cardiovascular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, F., Brown, B. W., Jr., Lamendola, C., McLaughlin, T., & Reaven, G. M. (2002). Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol*, *40*(5), 937-943.
- Achan, V., Broadhead, M., Malaki, M., Whitley, G., Leiper, J., MacAllister, R., & Vallance, P. (2003). Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(8), 1455-1459.
- Afshin, A., Forouzanfar, M. H., Reitsma, M. B., Sur, P., Estep, K., Lee, A., Marczak, L., Mokdad, A. H., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Salama, J. S., Vos, T., Abate, K. H., Abbafati, C., Ahmed, M. B., Al-Aly, Z., Alkerwi, A., Al-Raddadi, R., Amare, A. T., Amberbir, A., Amegah, A. K., Amini, E., Amrock, S. M., Anjana, R. M., Arnlov, J., Asayesh, H., Banerjee, A., Barac, A., Baye, E., Bennett, D. A., Beyene, A. S., Biadgilign, S., Biryukov, S., Bjertness, E., Boneya, D. J., Campos-Nonato, I., Carrero, J. J., Cecilio, P., Cercy, K., Ciobanu, L. G., Cornaby, L., Damtew, S. A., Dandona, L., Dandona, R., Dharmaratne, S. D., Duncan, B. B., Eshrati, B., Esteghamati, A., Feigin, V. L., Fernandes, J. C., Furst, T., Gebrehiwot, T. T., Gold, A., Gona, P. N., Goto, A., Habtewold, T. D., Hadush, K. T., Hafezi-Nejad, N., Hay, S. I., Horino, M., Islami, F., Kamal, R., Kasaeian, A., Katikireddi, S. V., Kengne, A. P., Kesavachandran, C. N., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Khubchandani, J., Kim, D., Kim, Y. J., Kinfu, Y., Kosen, S., Ku, T., Defo, B. K., Kumar, G. A., Larson, H. J., Leinsalu, M., Liang, X., Lim, S. S., Liu, P., Lopez, A. D., Lozano, R., Majeed, A., Malekzadeh, R., Malta, D. C., Mazidi, M., McAlinden, C., McGarvey, S. T., Mengistu, D. T., Mensah, G. A., Mensink, G. B. M., Mezgebe, H. B., Mirrakhimov, E. M., Mueller, U. O., Noubiap, J. J., Obermeyer, C. M., Ogbo, F. A., Owolabi, M. O., Patton, G. C., Pourmalek, F., Qorbani, M., Rafay, A., Rai, R. K., Ranabhat, C. L., Reinig, N., Safiri, S., Salomon, J. A., Sanabria, J. R., Santos, I. S., Sartorius, B., Sawhney, M., Schmidhuber, J., Schutte, A. E., Schmidt, M. I., Sepanlou, S. G., Shamsizadeh, M., Sheikbahaei, S., Shin, M. J., Shiri, R., Shiue, I., Roba, H. S., Silva, D. A. S., Silverberg, J. I., Singh, J. A., Stranges, S., Swaminathan, S., Tabares-Seisdedos, R., Tadese, F., Tedla, B. A., Tegegne, B. S., Terkawi, A. S., Thakur, J. S., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Tyrovolas, S., Ukwaja, K. N., Uthman, O. A., Vaezghasemi, M., Vasankari, T., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Weiderpass, E., Werdecker, A., Wesana, J., Westerman, R., Yano, Y., Yonemoto, N., Yonga, G., Zaidi, Z., Zenebe, Z. M., Zipkin, B., & Murray, C. J. L. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*, *377*(1), 13-27.
- Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R. D., Greenstein, A. S., & Heagerty, A. M. (2015). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res*, *52*(5), 299-305.
- Ago, T., Kitazono, T., Ooboshi, H., Iyama, T., Han, Y. H., Takada, J., Wakisaka, M., Ibayashi, S., Utsumi, H., & Iida, M. (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*, *109*(2), 227-233.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, *357*(Pt 3), 593-615.
- Ali, M. I., Ketsawatsomkron, P., Belin de Chantemele, E. J., Mintz, J. D., Muta, K., Salet, C., Black, S. M., Tremblay, M. L., Fulton, D. J., Marrero, M. B., & Stepp, D. W. (2009). Deletion of protein tyrosine phosphatase 1b improves peripheral insulin

- resistance and vascular function in obese, leptin-resistant mice via reduced oxidant tone. *Circ Res*, 105(10), 1013-1022. doi:10.1161/circresaha.109.206318
- AMA. (2013). Recognition of Obesity as a Disease. American Medical Association House of Delegates. <http://www.npr.org/documents/2013/jun/ama-resolution-obesity.pdf>
- Arehart, E., Gleim, S., Kasza, Z., Fetalvero, K. M., Martin, K. A., & Hwa, J. (2007). Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease. *Curr Med Chem*, 14(20), 2161-2169.
- Arrigoni, F., Ahmetaj, B., & Leiper, J. (2010). The biology and therapeutic potential of the DDAH/ADMA pathway. *Curr Pharm Des*, 16(37), 4089-4102.
- Asagami, T., Abbasi, F., Stuelinger, M., Lamendola, C., McLaughlin, T., Cooke, J. P., Reaven, G. M., & Tsao, P. S. (2002). Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 51(7), 843-846.
- Ascaso, J. F., Romero, P., Real, J. T., Priego, A., Valdecabres, C., & Carmena, R. (2001). [Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population]. *Med Clin (Barc)*, 117(14), 530-533.
- Bagi, Z., Feher, A., & Cassuto, J. (2012). Microvascular responsiveness in obesity: implications for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol*, 165(3), 544-560.
- Bagi, Z., Toth, E., Koller, A., & Kaley, G. (2004). Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(2), H626-633.
- Bailey, I. A., Blackwell, C. P., & Woodward, B. (1988). Chemiluminescence measurements of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity in four types of cardiovascular cell. *Basic Res Cardiol*, 83(4), 392-400.
- Ball, R. O., Urschel, K. L., & Pencharz, P. B. (2007). Nutritional consequences of interspecies differences in arginine and lysine metabolism. *J Nutr*, 137(6 Suppl 2), 1626s-1641s.
- Bastien, M., Poirier, P., Lemieux, I., & Despres, J. P. (2014). Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*, 56(4), 369-381.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), C1424-1437.
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.
- Behringer, E. J., & Segal, S. S. (2012). Spreading the signal for vasodilatation: implications for skeletal muscle blood flow control and the effects of ageing. *J Physiol*, 590(24), 6277-6284.
- Bendall, J. K., Alp, N. J., Warrick, N., Cai, S., Adlam, D., Rockett, K., Yokoyama, M., Kawashima, S., & Channon, K. M. (2005). Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res*, 97(9), 864-871.
- Bendall, J. K., Douglas, G., McNeill, E., Channon, K. M., & Crabtree, M. J. (2014). Tetrahydrobiopterin in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal*, 20(18), 3040-3077.

- Berry, C. E., & Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, *555*(Pt 3), 589-606.
- Bersani, F. S., Wolkowitz, O. M., Lindqvist, D., Yehuda, R., Flory, J., Bierer, L. M., Makotina, I., Abu-Amara, D., Coy, M., Reus, V. I., Epel, E. S., Marmar, C., & Mellon, S. H. (2016). Global arginine bioavailability, a marker of nitric oxide synthetic capacity, is decreased in PTSD and correlated with symptom severity and markers of inflammation. *Brain Behav Immun*, *52*, 153-160.
- Bertera, F. M., Santa-Cruz, D. M., Balestrasse, K. B., Gorzalczy, S. B., Hocht, C., Taira, C. A., & Polizio, A. H. (2014). Tempol-nebivolol therapy potentiates hypotensive effect increasing NO bioavailability and signaling pathway. *Free Radic Res*, *48*(2), 109-118.
- Beyers, L. M., Braam, B., Post, J. A., van Zonneveld, A. J., Rabelink, T. J., Koomans, H. A., Verhaar, M. C., & Joles, J. A. (2006). Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*, *47*(1), 87-94.
- Biedermann, B. C. (2001). Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity. *News Physiol Sci*, *16*, 84-88.
- Blair, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Conrad, P. A., & Smart, E. J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem*, *274*(45), 32512-32519.
- Bloomgarden, Z. T. (2002). Obesity, Hypertension, and Insulin Resistance. *Diabetes Care*, *25*(11), 2088-2097.
- Boegehold, M. A., Drenjancevic, I., & Lombard, J. H. (2015). Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. *Compr Physiol*, *6*(1), 215-254.
- Bogdanski, P., Suliburska, J., Grabanska, K., Musialik, K., Cieslewicz, A., Skoluda, A., & Jablecka, A. (2012). Effect of 3-month L-arginine supplementation on insulin resistance and tumor necrosis factor activity in patients with visceral obesity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *16*(6), 816-823.
- Bogdanski, P., Suliburska, J., Szulinska, M., Sikora, M., Walkowiak, J., & Jakubowski, H. (2015). L-Arginine and vitamin C attenuate pro-atherogenic effects of high-fat diet on biomarkers of endothelial dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother*, *76*, 100-106.
- Boger, R. H. (2004). Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr*, *134*(10 Suppl), 2842S-2847S; discussion 2853S.
- Böger, R. H., & Bode-Böger, S. M. (2001). THE CLINICAL PHARMACOLOGY OF L-ARGININE. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *41*(1), 79-99.
- Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Brandes, R. P., Phivthong-ngam, L., Bohme, M., Nafe, R., Mugge, A., & Frolich, J. C. (1997). Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation*, *96*(4), 1282-1290.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseaume, E., Chauvin, M. A., Morio, B., Vidal, H., & Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*, *118*(2), 789-800.

- Bouras, G., Deftereos, S., Tousoulis, D., Giannopoulos, G., Chatzis, G., Tsounis, D., Cleman, M. W., & Stefanadis, C. (2013). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): a promising biomarker for cardiovascular disease? *Curr Top Med Chem*, *13*(2), 180-200.
- Bourque, S. L., Davidge, S. T., & Adams, M. A. (2011). The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *300*(6), R1288-1295.
- Bouvet, C., Belin de Chantemele, E., Guihot, A. L., Vessieres, E., Bocquet, A., Dumont, O., Jardel, A., Loufrani, L., Moreau, P., & Henrion, D. (2007). Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension*, *50*(1), 248-254.
- Brame, L., Verma, S., Anderson, T., Lteif, A., & Mather, K. (2004). Insulin resistance as a therapeutic target for improved endothelial function: metformin. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, *4*(1), 53-63.
- Brant, L. C., Wang, N., Ojeda, F. M., LaValley, M., Barreto, S. M., Benjamin, E. J., Mitchell, G. F., Vasan, R. S., Palmisano, J. N., Munzel, T., Blankenberg, S., Wild, P. S., Zeller, T., Ribeiro, A. L., Schnabel, R. B., & Hamburg, N. M. (2017). Relations of Metabolically Healthy and Unhealthy Obesity to Digital Vascular Function in Three Community-Based Cohorts: A Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*, *6*(3).
- Bruce, K. D., & Hanson, M. A. (2010). The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr*, *140*(3), 648-652.
- Burke, G. L., Bertoni, A. G., Shea, S., Tracy, R., Watson, K. E., Blumenthal, R. S., Chung, H., & Carnethon, M. R. (2008). The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Intern Med*, *168*(9), 928-935.
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P. M., & Weston, A. H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*, *23*(8), 374-380.
- Cahill, P. A., & Redmond, E. M. (2016). Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, *248*, 97-109. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, *87*(10), 840-844.
- Candela, J., Wang, R., & White, C. (2017). Microvascular Endothelial Dysfunction in Obesity Is Driven by Macrophage-Dependent Hydrogen Sulfide Depletion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *37*(5), 889-899.
- Capettini, L. S., Cortes, S. F., Gomes, M. A., Silva, G. A., Pesquero, J. L., Lopes, M. J., Teixeira, M. M., & Lemos, V. S. (2008). Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *295*(6), H2503-2511.
- Cayatte, A. J., Palacino, J. J., Horten, K., & Cohen, R. A. (1994). Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*, *14*(5), 753-759.
- Cooke, J. P., & Oka, R. K. (2002). Does leptin cause vascular disease? *Circulation*, *106*(15), 1904-1905.
- Costa, Villela, N. R., Souza, M., Boa, B. C., Cyrino, F. Z., Silva, S. V., Lisboa, P. C., Moura, E. G., Barja-Fidalgo, T. C., & Bouskela, E. (2011). High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc Res*, *82*(3), 416-422.

- Costa, E. D., Rezende, B. A., Cortes, S. F., & Lemos, V. S. (2016). Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol*, *7*, 206.
- Chang, K. H., Park, J. M., Lee, C. H., Kim, B., Choi, K. C., Choi, S. J., Lee, K., & Lee, M. Y. (2017). NADPH oxidase (NOX) 1 mediates cigarette smoke-induced superoxide generation in rat vascular smooth muscle cells. *Toxicol In Vitro*, *38*, 49-58.
- Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., & Quon, M. J. (2003). Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, *278*(45), 45021-45026.
- Chen, P., Xia, K., Zhao, Z., Deng, X., & Yang, T. (2012). Atorvastatin modulates the DDAH1/ADMA system in high-fat diet-induced insulin-resistant rats with endothelial dysfunction. *Vasc Med*, *17*(6), 416-423.
- Chou, C. L., Pang, C. Y., Lee, T. J., & Fang, T. C. (2013). Direct renin inhibitor prevents and ameliorates insulin resistance, aortic endothelial dysfunction and vascular remodeling in fructose-fed hypertensive rats. *Hypertens Res*, *36*(2), 123-128.
- Chuaiphichai, S., Crabtree, M. J., McNeill, E., Hale, A. B., Trelfa, L., Channon, K. M., & Douglas, G. (2017). A key role for tetrahydrobiopterin-dependent endothelial NOS regulation in resistance arteries: studies in endothelial cell tetrahydrobiopterin-deficient mice. *Br J Pharmacol*, *174*(8), 657-671.
- Chung, J. H., Moon, J., Lee, Y. S., Chung, H. K., Lee, S. M., & Shin, M. J. (2014). Arginase inhibition restores endothelial function in diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, *451*(2), 179-183.
- Das, Biswas, S., Mukherjee, S., & Bandyopadhyay, S. K. (2016). Association of Oxidative Stress and Obesity with Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Mymensingh Med J*, *25*(1), 148-152.
- Das, Repossi, G., Dain, A., & Eynard, A. R. (2011). L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *16*, 13-20.
- Davel, A. P., Wenceslau, C. F., Akamine, E. H., Xavier, F. E., Couto, G. K., Oliveira, H. T., & Rossoni, L. V. (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res*, *44*(9), 920-932.
- Davenport, A. P., Hyndman, K. A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D. E., Pollock, J. S., Pollock, D. M., Webb, D. J., & Maguire, J. J. (2016). Endothelin. *Pharmacol Rev*, *68*(2), 357-418.
- DeMarco, V. G., Aroor, A. R., & Sowers, J. R. (2014). The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat Rev Endocrinol*, *10*(6), 364-376.
- Den Hartigh, L. J., Omer, M., Goodspeed, L., Wang, S., Wietecha, T., O'Brien, K. D., & Han, C. Y. (2017). Adipocyte-Specific Deficiency of NADPH Oxidase 4 Delays the Onset of Insulin Resistance and Attenuates Adipose Tissue Inflammation in Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *37*(3), 466-475.
- Després, J.-P., Lamarche, B., Mauriège, P., Cantin, B., Dagenais, G. R., Moorjani, S., & Lupien, P.-J. (1996). Hyperinsulinemia as an Independent Risk Factor for Ischemic Heart Disease. *New England Journal of Medicine*, *334*(15), 952-958.
- Deveaux, A., Pham, I., West, S. G., Andre, E., Lantoin-Adam, F., Bunouf, P., Sadi, S., Hermier, D., Mathe, V., Fouillet, H., Huneau, J. F., Benamouzig, R., & Mariotti, F. (2016). L-Arginine Supplementation Alleviates Postprandial Endothelial Dysfunction When Baseline Fasting Plasma Arginine Concentration Is Low: A

- Randomized Controlled Trial in Healthy Overweight Adults with Cardiometabolic Risk Factors. *J Nutr*, 146(7), 1330-1340.
- Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., Harrison, D. G., & Dikalov, S. I. (2010). Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res*, 107(1), 106-116.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-605.
- Dioguardi, F. S. (2011). To give or not to give? Lessons from the arginine paradox. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 4(2), 90-98.
- Doehner, W., & Anker, S. D. (2005). Xanthine oxidase inhibition for chronic heart failure: is allopurinol the next therapeutic advance in heart failure? *Heart*, 91(6), 707-709.
- Dogne, J. M., de Leval, X., Hanson, J., Frederich, M., Lambermont, B., Ghuysen, A., Casini, A., Masereel, B., Ruan, K. H., Pirotte, B., & Kolh, P. (2004). New developments on thromboxane and prostacyclin modulators part I: thromboxane modulators. *Curr Med Chem*, 11(10), 1223-1241.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95.
- Ducimetiere, P., Eschwege, E., Papoz, L., Richard, J. L., Claude, J. R., & Rosselin, G. (1980). Relationship of plasma insulin levels to the incidence of myocardial infarction and coronary heart disease mortality in a middle-aged population. *Diabetologia*, 19(3), 205-210.
- Durante, Johnson, F. K., & Johnson, R. A. (2007). Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(9), 906-911.
- El-Bassossy, H. M., El-Fawal, R., Fahmy, A., & Watson, M. L. (2013). Arginase inhibition alleviates hypertension in the metabolic syndrome. *Br J Pharmacol*, 169(3), 693-703.
- El-Bassossy, H. M., & Watson, M. L. (2015). Xanthine oxidase inhibition alleviates the cardiac complications of insulin resistance: effect on low grade inflammation and the angiotensin system. *J Transl Med*, 13, 82.
- El Assar, M., Angulo, J., Santos-Ruiz, M., Moreno, P., Novials, A., Villanueva-Penacarrillo, M. L., & Rodriguez-Manas, L. (2015a). Differential effect of amylin on endothelial-dependent vasodilation in mesenteric arteries from control and insulin resistant rats. *PLoS One*, 10(3), e0120479.
- El Assar, M., Ruiz de Adana, J. C., Angulo, J., Pindado Martinez, M. L., Hernandez Matias, A., & Rodriguez-Manas, L. (2013). Preserved endothelial function in human obesity in the absence of insulin resistance. *J Transl Med*, 11, 263.
- El Assar, M., Sanchez-Puelles, J. M., Royo, I., Lopez-Hernandez, E., Sanchez-Ferrer, A., Acena, J. L., Rodriguez-Manas, L., & Angulo, J. (2015b). FM19G11 reverses endothelial dysfunction in rat and human arteries through stimulation of the PI3K/Akt/eNOS pathway, independently of mTOR/HIF-1 α activation. *Br J Pharmacol*, 172(5), 1277-1291.
- Elms, S., Chen, F., Wang, Y., Qian, J., Askari, B., Yu, Y., Pandey, D., Iddings, J., Caldwell, R. B., & Fulton, D. J. (2013). Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(5), H651-666.

- Ellinsworth, D. C., Shukla, N., Fleming, I., & Jeremy, J. Y. (2014). Interactions between thromboxane A₂, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc Res*, *102*(1), 9-16.
- Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *291*(3), H985-1002.
- Feletou, M., & Vanhoutte, P. M. (2009). EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*, *117*(4), 139-155.
- Ferguson, R. D., Gallagher, E. J., Scheinman, E. J., Damouni, R., & LeRoith, D. (2013). The epidemiology and molecular mechanisms linking obesity, diabetes, and cancer. *Vitam Horm*, *93*, 51-98.
- Feron, O., Dessy, C., Desager, J. P., & Balligand, J. L. (2001). Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation*, *103*(1), 113-118.
- Flavahan, N. A. (1992). Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation*, *85*(5), 1927-1938.
- Fontaine, K. R., Redden, D. T., Wang, C., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2003). Years of life lost due to obesity. *Jama*, *289*(2), 187-193.
- Forstermann, U. (2008). Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, *5*(6), 338-349.
- Forstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, *33*(7), 829-837, 837a-837d.
- Fujii, N., Tsuchihashi, K., Sasao, H., Eguchi, M., Miurakami, H., Hase, M., Higashiura, K., Yuda, S., Hashimoto, A., Miura, T., Ura, N., & Shimamoto, K. (2008). Insulin resistance functionally limits endothelium-dependent coronary vasodilation in nondiabetic patients. *Heart Vessels*, *23*(1), 9-15.
- Fulton, D., Harris, M. B., Kemp, B. E., Venema, R. C., Marrero, M. B., & Stepp, D. W. (2004). Insulin resistance does not diminish eNOS expression, phosphorylation, or binding to HSP-90. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *287*(6), H2384-2393.
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, *288*(5789), 373-376.
- Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N., & Walsh, K. (2016). Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ Res*, *118*(11), 1786-1807.
- Galvao, R., Plavnik, F. L., Ribeiro, F. F., Ajzen, S. A., Christofalo, D. M., & Kohlmann, O., Jr. (2012). Effects of different degrees of insulin sensitivity on endothelial function in obese patients. *Arq Bras Cardiol*, *98*(1), 45-51.
- Garcia, S. D., Sanz, S. D., & Sanz, A. D. (2013). [Type 2 diabetes mellitus and obesity: should we treat the obesity or the diabetes?]. *Med Clin (Barc)*, *141* Suppl 2, 14-19.
- Gentile, M. T., Vecchione, C., Marino, G., Aretini, A., Di Pardo, A., Antenucci, G., Maffei, A., Cifelli, G., Iorio, L., Landolfi, A., Frati, G., & Lembo, G. (2008). Resistin impairs insulin-evoked vasodilation. *Diabetes*, *57*(3), 577-583.
- Ghoorah, K., Campbell, P., Kent, A., Maznyczka, A., & Kunadian, V. (2016). Obesity and cardiovascular outcomes: a review. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, *5*(1), 77-85.

- Gianni, D., DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2011). Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation. *Eur J Cell Biol*, *90*(2-3), 164-171.
- Gomis, R., Artola, S., Conthe, P., Vidal, J., Casamor, R., & Font, B. (2014). [Prevalence of type 2 diabetes mellitus in overweight or obese outpatients in Spain. OBEDIA Study]. *Med Clin (Barc)*, *142*(11), 485-492.
- Goodyear, L. J., Giorgino, F., Sherman, L. A., Carey, J., Smith, R. J., & Dohm, G. L. (1995). Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*, *95*(5), 2195-2204.
- Goossens, G. H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*, *94*(2), 206-218.
- Grassi, G., & Diez, J. (2009). Obesity-related cardiac and vascular structural alterations: beyond blood pressure overload. *J Hypertens*, *27*(9), 1750-1752.
- Gutierrez-Salmeron, M., Chocarro-Calvo, A., Garcia-Martinez, J. M., de la Vieja, A., & Garcia-Jimenez, C. (2017). Epidemiological bases and molecular mechanisms linking obesity, diabetes, and cancer. *Endocrinol Diabetes Nutr*, *64*(2), 109-117.
- Hadi, H. A., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag*, *1*(3), 183-198.
- Hasegawa, K., Wakino, S., Kimoto, M., Minakuchi, H., Fujimura, K., Hosoya, K., Komatsu, M., Kaneko, Y., Kanda, T., Tokuyama, H., Hayashi, K., & Itoh, H. (2013). The hydrolase DDAH2 enhances pancreatic insulin secretion by transcriptional regulation of secretagogin through a Sirt1-dependent mechanism in mice. *Faseb j*, *27*(6), 2301-2315.
- Haslam, D. W., & James, W. P. (2005). Obesity. *Lancet*, *366*(9492), 1197-1209.
- Havlinova, Z., Babicova, A., Hroch, M., & Chladek, J. (2013). Comparative pharmacokinetics of N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine, an arginase inhibitor, after single-dose intravenous, intraperitoneal and intratracheal administration to brown Norway rats. *Xenobiotica*, *43*(10), 886-894.
- Higashi, Y., Maruhashi, T., Noma, K., & Kihara, Y. (2014). Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. *Trends Cardiovasc Med*, *24*(4), 165-169.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., & Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, *73*(3), 411-418.
- Higgins, P., Dawson, J., Lees, K. R., McArthur, K., Quinn, T. J., & Walters, M. R. (2012). Xanthine oxidase inhibition for the treatment of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Ther*, *30*(4), 217-226.
- Hill, B. G., Dranka, B. P., Bailey, S. M., Lancaster, J. R., & Darley-Usmar, V. M. (2010). What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *J Biol Chem*, *285*(26), 19699-19704.
- Hoehn, K. L., Salmon, A. B., Hohnen-Behrens, C., Turner, N., Hoy, A. J., Maghzal, G. J., Stocker, R., Van Remmen, H., Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Richardson, A. R., & James, D. E. (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(42), 17787-17792.
- Holzmann, S. (1982). Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *J Cyclic Nucleotide Res*, *8*(6), 409-419.

- Honing, M. L., Smits, P., Morrison, P. J., & Rabelink, T. J. (2000). Bradykinin-induced vasodilation of human forearm resistance vessels is primarily mediated by endothelium-dependent hyperpolarization. *Hypertension*, *35*(6), 1314-1318.
- Hossain, P., Kavar, B., & El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med*, *356*(3), 213-215.
- Howard, G., O'Leary, D. H., Zaccaro, D., Haffner, S., Rewers, M., Hamman, R., Selby, J. V., Saad, M. F., Savage, P., & Bergman, R. (1996). Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation*, *93*(10), 1809-1817.
- Hsu, C. P., Hsu, P. F., Chung, M. Y., Lin, S. J., & Lu, T. M. (2014). Asymmetric dimethylarginine and long-term adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes: relation with the glycemic control. *Cardiovasc Diabetol*, *13*, 156.
- Hu, X., Xu, X., Zhu, G., Atzler, D., Kimoto, M., Chen, J., Schwedhelm, E., Luneburg, N., Boger, R. H., Zhang, P., & Chen, Y. (2009). Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation*, *120*(22), 2222-2229.
- Huang, R., Abdelmoneim, S. S., Nholu, L. F., Basu, R., Basu, A., & Mulvagh, S. L. (2015). Relationship between glycosylated hemoglobin A1c and coronary flow reserve in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, *13*(4), 445-453.
- Huynh, N. N., Harris, E. E., Chin-Dusting, J. F., & Andrews, K. L. (2009). The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*, *156*(1), 84-93.
- ICO. (2010). 11th Congress on Obesity. https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/ps-wof-webdev/site_media/uploads/Final_artwork_congress_guide_approved_21.06.10.pdf
- Igic, R., & Skrbic, R. (2014). The renin-angiotensin system and its blockers. *Srp Arh Celok Lek*, *142*(11-12), 756-763.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., & Wood, K. S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, *61*(6), 866-879.
- INE. (2011-2012a). Índice de masa corporal por nacionalidad y periodo. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?type=pcaxis&path=/t00/ICV/dim3/I0/&file=33106.px>
- INE. (2011-2012b). Índice de masa corporal por nivel de educación y periodo. Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?type=pcaxis&path=/t00/ICV/dim3/I0/&file=33105.px>
- INE. (2014). Índice de masa corporal. Instituto Nacional de Estadística. http://www.ine.es/jaxi/Datos.htm?type=pcaxis&path=/t00/mujeres_hombres/tabras_2/I0/&file=d6g1.px
- Ioannou, G. N., Bryson, C. L., & Boyko, E. J. (2007). Prevalence and trends of insulin resistance, impaired fasting glucose, and diabetes. *J Diabetes Complications*, *21*(6), 363-370.

- Jackson, S. P. (2011). Arterial thrombosis[mdash]insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*, 17(11), 1423-1436. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2515>
- Jeong, E. M., Chung, J., Liu, H., Go, Y., Gladstein, S., Farzaneh-Far, A., Lewandowski, E. D., & Dudley, S. C., Jr. (2016). Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. *J Am Heart Assoc*, 5(5).
- Jokinen, E. (2015). Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr*, 67(1), 25-32.
- Jonk, A. M., Houben, A. J., de Jongh, R. T., Serne, E. H., Schaper, N. C., & Stehouwer, C. D. (2007). Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology (Bethesda)*, 22, 252-260.
- Kaoukis, A., Deftereos, S., Raisakis, K., Giannopoulos, G., Bouras, G., Panagopoulou, V., Papoutsidakis, N., Cleman, M. W., & Stefanadis, C. (2013). The role of endothelin system in cardiovascular disease and the potential therapeutic perspectives of its inhibition. *Curr Top Med Chem*, 13(2), 95-114.
- Karalliedde, J., & Gnudi, L. (2016). Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 31(2), 206-213.
- Karlsson, W. K., Sorensen, C. G., & Kruuse, C. (2017). L-arginine and L-NMMA for assessing cerebral endothelial dysfunction in ischaemic cerebrovascular disease: A systematic review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 44(1), 13-20.
- Kaschina, E., Namsolleck, P., & Unger, T. (2017). AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Res*, 125(Pt A), 39-47.
- Kashyap, S. R., Lara, A., Zhang, R., Park, Y. M., & DeFronzo, R. A. (2008). Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 31(1), 134-139.
- Katakam, P. V., Ujhelyi, M. R., Hoenig, M. E., & Miller, A. W. (1998). Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol*, 275(3 Pt 2), R788-792.
- Kaul, K., Apostolopoulou, M., & Roden, M. (2015). Insulin resistance in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism*, 64(12), 1629-1639. doi:10.1016/j.metabol.2015.09.002
- Kearney, M. T., Duncan, E. R., Kahn, M., & Wheatcroft, S. B. (2008). Insulin resistance and endothelial cell dysfunction: studies in mammalian models. *Exp Physiol*, 93(1), 158-163.
- Kehrer, J. P., & Klotz, L. O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol*, 45(9), 765-798.
- Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., & Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280(5), E745-751.
- Ketonen, J., Pilvi, T., & Mervaala, E. (2010a). Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice. *Heart Vessels*, 25.
- Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E., & Mervaala, E. (2010b). Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J*, 74(7), 1479-1487.
- Kibbe, M., Billiar, T., & Tzeng, E. (1999). Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res*, 43(3), 650-657.

- Kluge, M. A., Fetterman, J. L., & Vita, J. A. (2013). Mitochondria and Endothelial Function. *Circ Res*, *112*(8), 1171-1188.
- Kobayasi, R., Akamine, E. H., Davel, A. P., Rodrigues, M. A., Carvalho, C. R., & Rossoni, L. V. (2010). Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens*, *28*(10), 2111-2119.
- Kocelak, P., Chudek, J., & Olszanecka-Glinianowicz, M. (2012). Prevalence of metabolic syndrome and insulin resistance in overweight and obese women according to the different diagnostic criteria. *Minerva Endocrinol*, *37*(3), 247-254.
- Kraehling, J. R., & Sessa, W. C. (2017). Contemporary Approaches to Modulating the Nitric Oxide-cGMP Pathway in Cardiovascular Disease. *Circ Res*, *120*(7), 1174-1182.
- Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J., & King, G. L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation*, *101*(6), 676-681.
- Kukat, A., & Trifunovic, A. (2009). Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*, *44*(1-2), 101-105.
- La Favor, J. D., Dubis, G. S., Yan, H., White, J. D., Nelson, M. A., Anderson, E. J., & Hickner, R. C. (2016). Microvascular Endothelial Dysfunction in Sedentary, Obese Humans Is Mediated by NADPH Oxidase: Influence of Exercise Training. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *36*(12), 2412-2420.
- Laakso, M., & Kuusisto, J. (2014). Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat Rev Endocrinol*, *10*(5), 293-302.
- Lahera, V., de Las Heras, N., Lopez-Farre, A., Manucha, W., & Ferder, L. (2017). Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension and Obesity. *Curr Hypertens Rep*, *19*(2), 11.
- Lai, L., & Ghebremariam, Y. T. (2016). Modulating DDAH/NOS Pathway to Discover Vasoprotective Insulin Sensitizers. *J Diabetes Res*, *2016*, 1982096.
- Lam, C. F., Peterson, T. E., Richardson, D. M., Croatt, A. J., d'Uscio, L. V., Nath, K. A., & Katusic, Z. S. (2006). Increased blood flow causes coordinated upregulation of arterial eNOS and biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *290*(2), H786-793.
- Lambeth, J. D., Krause, K. H., & Clark, R. A. (2008). NOX enzymes as novel targets for drug development. *Semin Immunopathol*, *30*(3), 339-363.
- Landmesser, U., & Harrison, D. G. (2001). Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation*, *104*(22), 2638-2640.
- Langouche, L., Vanhorebeek, I., Vlasselaers, D., Vander Perre, S., Wouters, P. J., Skogstrand, K., Hansen, T. K., & Van den Berghe, G. (2005). Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest*, *115*(8), 2277-2286.
- Leiper, J. M., Santa Maria, J., Chubb, A., MacAllister, R. J., Charles, I. G., Whitley, G. S., & Vallance, P. (1999). Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J*, *343 Pt 1*, 209-214.
- Li, Horke, S., & Forstermann, U. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends Pharmacol Sci*, *34*(6), 313-319.

- Li, Meininger, C. J., Hawker, J. R., Jr., Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M., Jr., & Wu, G. (2001). Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280(1), E75-82.
- Li, Meininger, C. J., Kelly, K. A., Hawker, J. R., Jr., Morris, S. M., Jr., & Wu, G. (2002). Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 282(1), R64-69.
- Liu, Q., & Gross, S. S. (1996). Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol*, 268, 311-324.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lobato, N. S., Filgueira, F. P., Akamine, E. H., Davel, A. P., Rossoni, L. V., Tostes, R. C., Carvalho, M. H., & Fortes, Z. B. (2011). Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 21(10), 808-816.
- Lopez-Jimenez, F., & Cortes-Bergoderi, M. (2011). Update: systemic diseases and the cardiovascular system (i): obesity and the heart. *Rev Esp Cardiol*, 64(2), 140-149.
- Lopez-Jimenez, F., Jacobsen, S. J., Reeder, G. S., Weston, S. A., Meverden, R. A., & Roger, V. L. (2004). Prevalence and secular trends of excess body weight and impact on outcomes after myocardial infarction in the community. *Chest*, 125(4), 1205-1212.
- Lteif, A. A., Han, K., & Mather, K. J. (2005). Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation*, 112(1), 32-38.
- Lu, Y., Hajifathalian, K., Ezzati, M., Woodward, M., Rimm, E. B., & Danaei, G. (2014). Metabolic mediators of the effects of body-mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants. *Lancet*, 383(9921), 970-983.
- Lucero, D., Lopez, G. I., Gorzalczany, S., Duarte, M., Gonzalez Ballerga, E., Sorda, J., Schreier, L., & Zago, V. (2016). Alterations in triglyceride rich lipoproteins are related to endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Clin Biochem*, 49(12), 932-935.
- Luiking, Y. C., Ten Have, G. A., Wolfe, R. R., & Deutz, N. E. (2012). Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 303(10), E1177-1189.
- Luksha, L., Agewall, S., & Kublickiene, K. (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202(2), 330-344.
- Luo, S., Lei, H., Qin, H., & Xia, Y. (2014). Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr Pharm Des*, 20(22), 3548-3553.
- Lupattelli, G., De Vuono, S., Boni, M., Helou, R., Raffaele Mannarino, M., Rita Roscini, A., Alaeddin, A., Pirro, M., & Vaudo, G. (2013). Insulin resistance and not BMI is the major determinant of early vascular impairment in patients with morbid obesity. *J Atheroscler Thromb*, 20(12), 924-933.
- Maachi, M., Pieroni, L., Bruckert, E., Jardel, C., Fellahi, S., Hainque, B., Capeau, J., & Bastard, J. P. (2004). Systemic low-grade inflammation is related to both

- circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28(8), 993-997.
- Maghzal, G. J., Krause, K. H., Stocker, R., & Jaquet, V. (2012). Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med*, 53(10), 1903-1918.
- Magne, J., Huneau, J. F., Borderie, D., Mathe, V., Bos, C., & Mariotti, F. (2015). Plasma asymmetric and symmetric dimethylarginine in a rat model of endothelial dysfunction induced by acute hyperhomocysteinemia. *Amino Acids*, 47(9), 1975-1982.
- Mahmoud, M. F., El-Nagar, M., & El-Bassossy, H. M. (2012). Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. *Arch Pharm Res*, 35(1), 155-162.
- Mandviwala, T., Khalid, U., & Deswal, A. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Curr Atheroscler Rep*, 18(5), 21.
- Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord*, 13(10), 423-444.
- Mao, Y., Luo, W., Zhang, L., Wu, W., Yuan, L., Xu, H., Song, J., Fujiwara, K., Abe, J. I., LeMaire, S. A., Wang, X. L., & Shen, Y. H. (2017). STING-IRF3 Triggers Endothelial Inflammation in Response to Free Fatty Acid-Induced Mitochondrial Damage in Diet-Induced Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37(5), 920-929.
- Martinez-Gonzalez, J., & Badimon, L. (2007). Influence of statin use on endothelial function: from bench to clinics. *Curr Pharm Des*, 13(17), 1771-1786.
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2013). Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract*, 7(5), e330-341.
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2014). Roles of oxidative stress, adiponectin, and nuclear hormone receptors in obesity-associated insulin resistance and cardiovascular risk. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 19(2), 75-88.
- Matsumoto, T., Kobayashi, S., Ando, M., Watanabe, S., Iguchi, M., Taguchi, K., & Kobayashi, T. (2017). Impaired endothelium-derived hyperpolarization-type relaxation in superior mesenteric arteries isolated from female Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Eur J Pharmacol*.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- McArdle, M., Finucane, O., Connaughton, R., McMorrow, A., & Roche, H. (2013). Mechanisms of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: Insights into the Emerging Role of Nutritional Strategies. *Frontiers in Endocrinology*, 4(52).
- McLaughlin, T., Abbasi, F., Lamendola, C., & Reaven, G. (2007). Heterogeneity in the prevalence of risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus in obese individuals: Effect of differences in insulin sensitivity. *Arch Intern Med*, 167(7), 642-648.
- McLaughlin, T., Stuhlinger, M., Lamendola, C., Abbasi, F., Bialek, J., Reaven, G. M., & Tsao, P. S. (2006). Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations are elevated in

- obese insulin-resistant women and fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(5), 1896-1900.
- Meshkani, R., & Adeli, K. (2009). Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem*, 42(13-14), 1331-1346.
- Meyers, M. R., & Gokce, N. (2007). Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 14(5), 365-369.
- Mielczarek-Puta, M., Chrzanowska, A., & Baranczyk-Kuzma, A. (2008). [New insights into arginase. Part I. Structure and characteristics]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 62, 206-213.
- Milstien, S., & Katusic, Z. (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*, 263(3), 681-684.
- Ming, X. F., Rajapakse, A. G., Yepuri, G., Xiong, Y., Carvas, J. M., Ruffieux, J., Scerri, I., Wu, Z., Popp, K., Li, J., Sartori, C., Scherrer, U., Kwak, B. R., Montani, J. P., & Yang, Z. (2012). Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *J Am Heart Assoc*, 1(4), e000992.
- Miyajima, A., Kosaka, T., Kikuchi, E., & Oya, M. (2015). Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. *Int J Urol*, 22(8), 721-730.
- Miyamoto, M., Kotani, K., Ishibashi, S., & Taniguchi, N. (2012). The effect of antihypertensive drugs on endothelial function as assessed by flow-mediated vasodilation in hypertensive patients. *Int J Vasc Med*, 2012, 453264.
- Moens, A. L., & Kass, D. A. (2006). Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(11), 2439-2444.
- Moens, A. L., Takimoto, E., Tocchetti, C. G., Chakir, K., Bedja, D., Cormaci, G., Ketner, E. A., Majmudar, M., Gabrielson, K., Halushka, M. K., Mitchell, J. B., Biswal, S., Channon, K. M., Wolin, M. S., Alp, N. J., Paolocci, N., Champion, H. C., & Kass, D. A. (2008). Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation*, 117(20), 2626-2636.
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., & Vane, J. R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263(5579), 663-665.
- Moncada, S., Herman, A. G., Higgs, E. A., & Vane, J. R. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res*, 11(3), 323-344.
- Moncada, S., & Higgs, E. A. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb j*, 9(13), 1319-1330.
- Moncada, S., Palmer, R. M., & Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43(2), 109-142.
- Montagnani, M., Chen, H., Barr, V. A., & Quon, M. J. (2001). Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem*, 276(32), 30392-30398.
- Montagnani, M., & Quon, M. J. (2000). Insulin action in vascular endothelium: potential mechanisms linking insulin resistance with hypertension. *Diabetes Obes Metab*, 2(5), 285-292.

- Montagnani, M., Ravichandran, L. V., Chen, H., Esposito, D. L., & Quon, M. J. (2002). Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide-dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol*, *16*(8), 1931-1942.
- Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2012). Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, *110*(1), 87-94.
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., & Groop, L. C. (2003). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, *34*(3), 267-273.
- Morris, S. M., Jr. (2002). Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, *22*, 87-105.
- Mulvany, M. J., & Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*, *41*(1), 19-26.
- Munzel, T., Daiber, A., Ullrich, V., & Mulsch, A. (2005). Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *25*(8), 1551-1557.
- Myung, S. C., Han, J. H., Song, K. K., Kang, G. H., Lee, S. Y., Kim, T. H., Lee, M. Y., Kim, H. W., & Kim, S. C. (2008). The effects of interleukin-6 on the contraction and relaxation responses of the cavernous smooth muscle from rats. *Eur J Pharmacol*, *589*(1-3), 228-232.
- Naka, K. K., Papathanassiou, K., Bechlioulis, A., Pappas, K., Kazakos, N., Kanioglou, C., Papafaklis, M. I., Kostoula, A., Vezyraki, P., Makriyiannis, D., Tsatsoulis, A., & Michalis, L. K. (2011). Rosiglitazone improves endothelial function in patients with type 2 diabetes treated with insulin. *Diab Vasc Dis Res*, *8*(3), 195-201.
- Nakahata, N. (2008). Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*, *118*(1), 18-35.
- Nandipati, K. C., Subramanian, S., & Agrawal, D. K. (2017). Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem*, *426*(1-2), 27-45.
- Nesher, N., Frolkis, I., Schwartz, D., Chernichovski, T., Levi, S., Pri-Paz, Y., Chernin, G., Shtabsky, A., Ben-Gal, Y., Paz, Y., & Schwartz, I. F. (2014). L-arginine improves endothelial function, independently of arginine uptake, in aortas from chronic renal failure female rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, *306*(4), F449-456.
- Nguyen Dinh Cat, A., & Touyz, R. M. (2011). A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides*, *32*(10), 2141-2150.
- Nguyen, M. C., Park, J. T., Jeon, Y. G., Jeon, B. H., Hoe, K. L., Kim, Y. M., Lim, H. K., & Ryoo, S. (2016). Arginase Inhibition Restores Peroxynitrite-Induced Endothelial Dysfunction via L-Arginine-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation. *Yonsei Med J*, *57*(6), 1329-1338.

- NIH. (2000). The Practical Guide. Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/guidelines/prctgd_c.pdf
- Nijveldt, R. J., Teerlink, T., Van Der Hoven, B., Siroen, M. P., Kuik, D. J., Rauwerda, J. A., & van Leeuwen, P. A. (2003). Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr*, 22(1), 23-30.
- Nikiforova, A. B., Fadeev, R. S., & Kruglov, A. G. (2013). Rapid fluorescent visualization of multiple NAD(P)H oxidoreductases in homogenate, permeabilized cells, and tissue slices. *Anal Biochem*, 440(2), 189-196.
- Ninomiya, J. K., L'Italien, G., Criqui, M. H., Whyte, J. L., Gamst, A., & Chen, R. S. (2004). Association of the Metabolic Syndrome With History of Myocardial Infarction and Stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*, 109(1), 42-46.
- Noronha, B. T., Li, J. M., Wheatcroft, S. B., Shah, A. M., & Kearney, M. T. (2005). Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes*, 54(4), 1082-1089.
- O'Connell, B. J., & Genest, J., Jr. (2001). High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation*, 104(16), 1978-1983.
- OECD. (2012). OBESITY UPDATE 2012. The Organisation for Economic Co-operation and Development. www.oecd.org/health/49716427.pdf
- OECD. (2014). OBESITY UPDATE 2014. The Organisation for Economic Co-operation and Development. www.oecd.org/health/Obesity-Update-2014.pdf
- Ogita, H., & Liao, J. (2004). Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*, 11(2), 123-132.
- Oliveros, E., Somers, V. K., Sochor, O., Goel, K., & Lopez-Jimenez, F. (2014). The concept of normal weight obesity. *Prog Cardiovasc Dis*, 56(4), 426-433.
- Olshansky, S. J., Passaro, D. J., Hershov, R. C., Layden, J., Carnes, B. A., Brody, J., Hayflick, L., Butler, R. N., Allison, D. B., & Ludwig, D. S. (2005). A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*, 352(11), 1138-1145.
- OMS. (2014). 10 Datos sobre la obesidad. Organización mundial de la salud. <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>
- OMS. (2015a). Enfermedades cardiovasculares. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
- OMS. (2015b). Obesidad y sobrepeso. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- OMS. (2016). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Orshal, J. M., & Khalil, R. A. (2004). Reduced endothelial NO-cGMP-mediated vascular relaxation and hypertension in IL-6-infused pregnant rats. *Hypertension*, 43(2), 434-444.
- Ortega, F. B., Lavie, C. J., & Blair, S. N. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease. *Circ Res*, 118(11), 1752-1770.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev*, 87(1), 315-424.

- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*(6122), 524-526.
- Pamuk, B. O., Torun, A. N., Kulaksizoglu, M., Ertugrul, D., Ciftci, O., Kulaksizoglu, S., Yildirim, E., & Demirag, N. G. (2010). Asymmetric dimethylarginine levels and carotid intima-media thickness in obese patients with polycystic ovary syndrome and their relationship to metabolic parameters. *Fertil Steril*, *93*(4), 1227-1233.
- Parkington, H. C., Coleman, H. A., & Tare, M. (2004). Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res*, *49*(6), 509-514.
- Patel, T. P., Rawal, K., Bagchi, A. K., Akolkar, G., Bernardes, N., Dias Dda, S., Gupta, S., & Singal, P. K. (2016). Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev*, *21*(1), 11-23.
- Patti, M. E., Butte, A. J., Crunkhorn, S., Cusi, K., Berria, R., Kashyap, S., Miyazaki, Y., Kohane, I., Costello, M., Saccone, R., Landaker, E. J., Goldfine, A. B., Mun, E., DeFronzo, R., Finlayson, J., Kahn, C. R., & Mandarino, L. J. (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(14), 8466-8471.
- Pernow, J., & Jung, C. (2013). Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*, *98*(3), 334-343.
- Pi-Sunyer, F. X. (2002). The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obes Res*, *10 Suppl 2*, 97s-104s.
- Piazza, M., Guillemette, J. G., & Dieckmann, T. (2015). Dynamics of nitric oxide synthase-calmodulin interactions at physiological calcium concentrations. *Biochemistry*, *54*(11), 1989-2000.
- Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., & Eckel, R. H. (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *26*(5), 968-976.
- Poirier, P., Martin, J., Marceau, P., Biron, S., & Marceau, S. (2004). Impact of bariatric surgery on cardiac structure, function and clinical manifestations in morbid obesity. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, *2*(2), 193-201.
- Pollock, J. S., Förstermann, U., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Schmidt, H. H., Nakane, M., & Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *88*(23), 10480-10484.
- Pope, A. J., Karuppiyah, K., & Cardounel, A. J. (2009). Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res*, *60*(6), 461-465.
- Preli, R. B., Klein, K. P., & Herrington, D. M. (2002). Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis*, *162*(1), 1-15.
- Prieto, D., Contreras, C., & Sanchez, A. (2014). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*, *12*(3), 412-426.
- Puissant, C., Abraham, P., Durand, S., Humeau-Heurtier, A., Faure, S., Rousseau, P., & Mahe, G. (2014). [Endothelial function: role, assessment and limits]. *J Mal Vasc*, *39*(1), 47-56.

- Pung, Y. F., Rocic, P., Murphy, M. P., Smith, R. A., Hafemeister, J., Ohanyan, V., Guarini, G., Yin, L., & Chilian, W. M. (2012). Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *32*(2), 325-334.
- Rabelo, L. A., Ferreira, F. O., Nunes-Souza, V., da Fonseca, L. J., & Goulart, M. O. (2015). Arginase as a Critical Prooxidant Mediator in the Binomial Endothelial Dysfunction-Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*, *2015*, 924860.
- Rapoport, R. M., & Murad, F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*, *52*(3), 352-357.
- Reaven, G. M. (2003). Importance of identifying the overweight patient who will benefit the most by losing weight. *Ann Intern Med*, *138*(5), 420-423.
- Reaven, G. M. (2011). Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am*, *95*(5), 875-892.
- Richette, P., Poitou, C., Manivet, P., Denis, J., Bouillot, J. L., Clement, K., Oppert, J. M., & Bardin, T. (2016). Weight Loss, Xanthine Oxidase, and Serum Urate Levels: A Prospective Longitudinal Study of Obese Patients. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, *68*(7), 1036-1042.
- Ristow, M. (2014). Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. *Nat Med*, *20*(7), 709-711.
- Rodriguez-Hernandez, H., Simental-Mendia, L. E., Rodriguez-Ramirez, G., & Reyes-Romero, M. A. (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol*, *2013*, 678159.
- Rodriguez-Mañas, L., Angulo, J., Vallejo, S., Peiro, C., Sanchez-Ferrer, A., Cercas, E., Lopez-Doriga, P., & Sanchez-Ferrer, C. F. (2003). Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia*, *46*(4), 556-566.
- Rodriguez-Mañas, L., El-Assar, M., Vallejo, S., Lopez-Doriga, P., Solis, J., Petidier, R., Montes, M., Nevado, J., Castro, M., Gomez-Guerrero, C., Peiro, C., & Sanchez-Ferrer, C. F. (2009). Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell*, *8*(3), 226-238.
- Rodriguez-Rodriguez, E., Perea, J. M., Lopez-Sobaler, A. M., & Ortega, R. M. (2009). [Obesity, insulin resistance and increase in adipokines levels: importance of the diet and physical activity]. *Nutr Hosp*, *24*(4), 415-421.
- Rudofsky, G., Roeder, E., Merle, T., Hildebrand, M., Nawroth, P. P., & Wolfrum, C. (2011). Weight loss improves endothelial function independently of ADMA reduction in severe obesity. *Horm Metab Res*, *43*(5), 343-348.
- Ryoo, Gupta, G., Benjo, A., Lim, H. K., Camara, A., Sikka, G., Lim, H. K., Sohi, J., Santhanam, L., Soucy, K., Tuday, E., Baraban, E., Ilies, M., Gerstenblith, G., Nyhan, D., Shoukas, A., Christianson, D. W., Alp, N. J., Champion, H. C., Huso, D., & Berkowitz, D. E. (2008). Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis. *Circ Res*, *102*(8), 923-932.
- Saavedra, J. M., & Armando, I. (2017). Angiotensin II AT2 Receptors Contribute to Regulate the Sympathoadrenal and Hormonal Reaction to Stress Stimuli. *Cell Mol Neurobiol*.
- Sagach, V., Bondarenko, A., Bazilyuk, O., & Kotsuruba, A. (2006). Endothelial dysfunction: Possible mechanisms and ways of correction. *Exp Clin Cardiol*, *11*(2), 107-110.

- Salazar, M. R., Carbajal, H. A., Espeche, W. G., Aizpurua, M., Leiva Sisniegues, C. E., Leiva Sisniegues, B. C., Stavile, R. N., March, C. E., & Reaven, G. M. (2016). Insulin resistance: The linchpin between prediabetes and cardiovascular disease. *Diab Vasc Dis Res*, *13*(2), 157-163.
- Sansbury, B. E., & Hill, B. G. (2014). Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, *73*, 383-399.
- Schramm, A., Matusik, P., Osmenda, G., & Guzik, T. J. (2012). Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol*, *56*(5-6), 216-231.
- Schulman, S. P., Becker, L. C., Kass, D. A., Champion, H. C., Terrin, M. L., Forman, S., Ernst, K. V., Kelemen, M. D., Townsend, S. N., Capriotti, A., Hare, J. M., & Gerstenblith, G. (2006). L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *Jama*, *295*(1), 58-64.
- Schunkert, H. (2002). Obesity and target organ damage: the heart. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *26* Suppl 4, S15-20.
- SEEDO. (2017). Clasificación del IMC según la Sociedad Española para el Estudio De la Obesidad. <http://www.seedo.es/index.php/pacientes/calculo-imc>
- Seidell, J. C. (2000). Obesity, insulin resistance and diabetes--a worldwide epidemic. *Br J Nutr*, *83* Suppl 1, S5-8.
- Shah, A. S., Gao, Z., Dolan, L. M., Dabelea, D., D'Agostino, R. B., Jr., & Urbina, E. M. (2015). Assessing endothelial dysfunction in adolescents and young adults with type 1 diabetes mellitus using a non-invasive heat stimulus. *Pediatr Diabetes*, *16*(6), 434-440.
- Shankar, R. R., Wu, Y., Shen, H. Q., Zhu, J. S., & Baron, A. D. (2000). Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes*, *49*(5), 684-687.
- Shawky, N. M., Shehatou, G. S., Abdel Rahim, M., Suddek, G. M., & Gameil, N. M. (2014). Levocetirizine ameliorates high fructose diet-induced insulin resistance, vascular dysfunction and hepatic steatosis in rats. *Eur J Pharmacol*, *740*, 353-363.
- Shinozaki, K., Kashiwagi, A., Nishio, Y., Okamura, T., Yoshida, Y., Masada, M., Toda, N., & Kikkawa, R. (1999). Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*, *48*(12), 2437-2445.
- Shinozaki, K., Nishio, Y., Okamura, T., Yoshida, Y., Maegawa, H., Kojima, H., Masada, M., Toda, N., Kikkawa, R., & Kashiwagi, A. (2000). Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res*, *87*(7), 566-573.
- Shu, X., Keller, T. C. t., Begandt, D., Butcher, J. T., Biwer, L., Keller, A. S., Columbus, L., & Isakson, B. E. (2015). Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci*, *72*(23), 4561-4575.
- Siervo, M., & Bluck, L. J. (2012). In vivo nitric oxide synthesis, insulin sensitivity, and asymmetric dimethylarginine in obese subjects without and with metabolic syndrome. *Metabolism*, *61*(5), 680-688.
- Sims, E. A. (2001). Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism*, *50*(12), 1499-1504.

- Siroen, M. P., Teerlink, T., Nijveldt, R. J., Prins, H. A., Richir, M. C., & van Leeuwen, P. A. (2006). The clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Annu Rev Nutr*, *26*, 203-228.
- Siroen, M. P., van Leeuwen, P. A., Nijveldt, R. J., Teerlink, T., Wouters, P. J., & Van den Berghe, G. (2005). Modulation of asymmetric dimethylarginine in critically ill patients receiving intensive insulin treatment: a possible explanation of reduced morbidity and mortality? *Crit Care Med*, *33*(3), 504-510.
- Siti, H. N., Kamisah, Y., & Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol*, *71*, 40-56.
- Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, *12*(4), 537-577.
- Snel, M., Sleddering, M. A., Pijl, H., Nieuwenhuizen, W. F., Frolich, M., Havekes, L. M., Romijn, J. A., & Jazet, I. M. (2010). The effect of dietary phytosphingosine on cholesterol levels and insulin sensitivity in subjects with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Nutr*, *64*(4), 419-423.
- Sorop, O., Olver, T. D., van de Wouw, J., Heinonen, I., van Duin, R. W., Duncker, D. J., & Merkus, D. (2017). The microcirculation: a key player in obesity-associated cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*.
- Spieker, & Pyzocha, N. (2016). Economic Impact of Obesity. *Prim Care*, *43*(1), 83-95, viii-ix.
- Spieker, L. E., Noll, G., & Luscher, T. F. (2001). Therapeutic potential for endothelin receptor antagonists in cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*, *1*(4), 293-303.
- Stapor, P., Wang, X., Goveia, J., Moens, S., & Carmeliet, P. (2014). Angiogenesis revisited - role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism. *J Cell Sci*, *127*(Pt 20), 4331-4341.
- Steinberg, H. O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., & Baron, A. D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*, *97*(11), 2601-2610.
- Stuhlinger, M. C., Abbasi, F., Chu, J. W., Lamendola, C., McLaughlin, T. L., Cooke, J. P., Reaven, G. M., & Tsao, P. S. (2002). Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Jama*, *287*(11), 1420-1426.
- Sturm, W., Sandhofer, A., Engl, J., Laimer, M., Molnar, C., Kaser, S., Weiss, H., Tilg, H., Ebenbichler, C. F., & Patsch, J. R. (2009). Influence of visceral obesity and liver fat on vascular structure and function in obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*, *17*(9), 1783-1788.
- Styskal, J., Van Remmen, H., Richardson, A., & Salmon, A. B. (2012). Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med*, *52*(1), 46-58.
- Su, J. B. (2015). Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol*, *7*(11), 719-741.
- Sukumar, P., Viswambharan, H., Imrie, H., Cubbon, R. M., Yuldasheva, N., Gage, M., Galloway, S., Skromna, A., Kandavelu, P., Santos, C. X., Gatenby, V. K., Smith, J., Beech, D. J., Wheatcroft, S. B., Channon, K. M., Shah, A. M., & Kearney, M. T.

- (2013). Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance-related endothelial cell dysfunction. *Diabetes*, 62(6), 2130-2134.
- Sun, Q. A., Hess, D. T., Wang, B., Miyagi, M., & Stamler, J. S. (2012). Off-target thiol alkylation by the NADPH oxidase inhibitor 3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidine (VAS2870). *Free Radic Biol Med*, 52(9), 1897-1902.
- Sydow, K., Mondon, C. E., Schrader, J., Konishi, H., & Cooke, J. P. (2008). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(4), 692-697.
- Szewczyk, A., Jarmuszkiewicz, W., Koziel, A., Sobieraj, I., Nobik, W., Lukasiak, A., Skup, A., Bednarczyk, P., Drabarek, B., Dymkowska, D., Wrzosek, A., & Zablocki, K. (2015). Mitochondrial mechanisms of endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep*, 67(4), 704-710.
- Taddei, S., Ghiadoni, L., Salvetti, G., Viridis, A., & Salvetti, A. (2006). [Obesity and endothelial dysfunction]. *G Ital Cardiol (Rome)*, 7(11), 715-723.
- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., Sudano, I., & Salvetti, A. (2002). Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs*, 62(2), 265-284.
- Tang, W. H., Wang, Z., Cho, L., Brennan, D. M., & Hazen, S. L. (2009). Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*, 53(22), 2061-2067.
- Tanrikulu-Kucuk, S., Kocak, H., Oner-Iyidogan, Y., Seyithanoglu, M., Topparmak, E., & Kayan-Tapan, T. (2015). Serum fetuin-A and arginase-1 in human obesity model: Is there any interaction between inflammatory status and arginine metabolism? *Scand J Clin Lab Invest*, 75(4), 301-307.
- Teixeira, G., Szyndralewicz, C., Molango, S., Carnesecchi, S., Heitz, F., Wiesel, P., & Wood, J. M. (2016). Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. *Br J Pharmacol*.
- Telen, M. J. (2014). Cellular adhesion and the endothelium: E-selectin, L-selectin, and pan-selectin inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am*, 28(2), 341-354.
- Teng, K. T., Chang, C. Y., Chang, L. F., & Nesaretnam, K. (2014). Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutr J*, 13, 12.
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028.
<http://ajplung.physiology.org/content/ajplung/279/6/L1005.full.pdf>
- The Emerging Risk Factors, C. (2011). Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *The Lancet*, 377(9771), 1085-1095.
- Tinkov, A. A., Sinitskii, A. I., Popova, E. V., Nemereshina, O. N., Gatiatulina, E. R., Skalnaya, M. G., Skalny, A. V., & Nikonov, A. A. (2015). Alteration of local adipose tissue trace element homeostasis as a possible mechanism of obesity-related insulin resistance. *Med Hypotheses*, 85(3), 343-347.
- Tousoulis, D., Boger, R. H., Antoniades, C., Siasos, G., Stefanadi, E., & Stefanadis, C. (2007). Mechanisms of disease: L-arginine in coronary atherosclerosis--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 4(5), 274-283.

- Toutouzas, K., Riga, M., Stefanadi, E., & Stefanadis, C. (2008). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other endogenous nitric oxide synthase (NOS) inhibitors as an important cause of vascular insulin resistance. *Horm Metab Res*, *40*(9), 655-659.
- Touyz, R. M., & Montezano, A. C. (2012). Vascular Nox4: A Multifarious NADPH Oxidase. *Circ Res*, *110*(9), 1159-1161.
- Tran, C. T., Fox, M. F., Vallance, P., & Leiper, J. M. (2000). Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics*, *68*(1), 101-105.
- Tran, L. T., Yuen, V. G., & McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*, *332*(1-2), 145-159.
- Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M., & Saha, S. (2017). Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*, *14*(4).
- Ulker, P., Gunduz, F., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2013). Nitric oxide generated by red blood cells following exposure to shear stress dilates isolated small mesenteric arteries under hypoxic conditions. *Clin Hemorheol Microcirc*, *54*(4), 357-369.
- Ulker, P., Yaras, N., Yalcin, O., Celik-Ozenci, C., Johnson, P. C., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2011). Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. *Nitric Oxide*, *24*(4), 184-191.
- Vallance, P., & Chan, N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*, *85*(3), 342-350.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., & Moncada, S. (1992a). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, *339*(8793), 572-575.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., & Moncada, S. (1992b). Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol*, *20* Suppl 12, S60-62.
- Vallejo, S., Angulo, J., Peiro, C., Nevado, J., Sanchez-Ferrer, A., Petidier, R., Sanchez-Ferrer, C. F., & Rodriguez-Manas, L. (2000). Highly glycated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetologia*, *43*(1), 83-90.
- Vanhoutte, P. M. (2008). Arginine and arginase: endothelial NO synthase double crossed? *Circ Res*, *102*(8), 866-868.
- Vanhoutte, P. M. (2009). Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J*, *73*(4), 595-601.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., & Martasek, P. (2003). The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res*, *37*(2), 121-127.
- Vickers, S., Schiller, H. J., Hildreth, J. E., & Bulkley, G. B. (1998). Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of the endothelial cell plasma membrane. *Surgery*, *124*(3), 551-560.
- Viridis, A., Santini, F., Colucci, R., Duranti, E., Salvetti, G., Rugani, I., Segnani, C., Anselmino, M., Bernardini, N., Blandizzi, C., Salvetti, A., Pinchera, A., & Taddei, S. (2011). Vascular generation of tumor necrosis factor-alpha reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *J Am Coll Cardiol*, *58*(3), 238-247.

- Vitale, C., Mercurio, G., Cornoldi, A., Fini, M., Volterrani, M., & Rosano, G. M. (2005). Metformin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *J Intern Med*, *258*(3), 250-256.
- Vitturi, D. A., & Patel, R. P. (2011). Current perspectives and challenges in understanding the role of nitrite as an integral player in nitric oxide biology and therapy. *Free Radic Biol Med*, *51*(4), 805-812.
- Walker, A. B., Chattington, P. D., Buckingham, R. E., & Williams, G. (1999). The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*, *48*(7), 1448-1453.
- Wallace, T. M., Levy, J. C., & Matthews, D. R. (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care*, *27*(6), 1487-1495.
- Wang, Lai, L. H., Yan, P., & Dong, P. S. (2017). Correlation between blood asymmetric dimethylarginine level and the complications of patients with cardiovascular diseases. *J Biol Regul Homeost Agents*, *31*(1), 133-139.
- Wang, Singer, A. H., Tsao, P. S., Drexler, H., Kosek, J., & Cooke, J. P. (1994). Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol*, *23*(2), 452-458.
- Whitlock, G., Lewington, S., Sherliker, P., Clarke, R., Emberson, J., Halsey, J., Qizilbash, N., Collins, R., & Peto, R. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*, *373*(9669), 1083-1096.
- Winters, B., Mo, Z., Brooks-Asplund, E., Kim, S., Shoukas, A., Li, D., Nyhan, D., & Berkowitz, D. E. (2000). Reduction of obesity, as induced by leptin, reverses endothelial dysfunction in obese (Lep(ob)) mice. *J Appl Physiol* (1985), *89*(6), 2382-2390.
- Wolf, A. M., Buffington, C., & Beisiegel, U. (2006). Comparison of metabolic risk factors between severely and very severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)*, *14*(12), 2177-2183.
- Yi, K. H., Hwang, J. S., Kim, E. Y., Lee, S. H., Kim, D. H., & Lim, J. S. (2014). Prevalence of insulin resistance and cardiometabolic risk in Korean children and adolescents: a population-based study. *Diabetes Res Clin Pract*, *103*(1), 106-113.
- Young EJ, H. M., Wiehler WB, Triggler CR & Reid JJ (2008). Reduced EDHF responses and connexin activity in mesenteric arteries from the insulin-resistant obese Zucker rat. *Diabetologia*, *51*, 872-881.
- Yu, Y., Rajapakse, A. G., Montani, J. P., Yang, Z., & Ming, X. F. (2014). p38 mitogen-activated protein kinase is involved in arginase-II-mediated eNOS-uncoupling in obesity. *Cardiovasc Diabetol*, *13*, 113.
- Zanchi, A., Delacretaz, E., Taleb, V., Gaillard, R., Jeanrenaud, B., Brunner, H. R., & Waeber, B. (1995). Endothelial function of the mesenteric arteriole and mechanical behaviour of the carotid artery in rats with insulin resistance and hypercholesterolaemia. *J Hypertens*, *13*(12 Pt 1), 1463-1470.
- Zeng, G., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Cong, L. N., Kirby, M., Mostowski, H., & Quon, M. J. (2000). Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*, *101*(13), 1539-1545.

- Zeng, G., & Quon, M. J. (1996). Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 98(4), 894-898.
- Zhao, L., Fu, Z., Wu, J., Aylor, K. W., Barrett, E. J., Cao, W., & Liu, Z. (2015). Inflammation-induced microvascular insulin resistance is an early event in diet-induced obesity. *Clin Sci (Lond)*, 129(12), 1025-1036.
- Zheng, J., Wang, K., Jin, P., Dong, C., Yuan, Q., Li, Y., & Yang, Z. (2013). The association of adipose-derived dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 with insulin sensitivity in experimental type 2 diabetes mellitus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45(8), 641-648.

ANEXO 1



OPENACCESS

Citation: El Assar M, Angulo J, Santos-Ruiz M, Moreno P, Novials A, Villanueva-Peñacarrillo ML, et al. (2015) Differential Effect of Amylin on Endothelial-Dependent Vasodilation in Mesenteric Arteries from Control and Insulin Resistant Rats. PLoS ONE 10(3): e0120479. doi:10.1371/journal.pone.0120479

Academic Editor: Hitoshi Ashida, Kobe University, JAPAN

Received: July 28, 2014

Accepted: January 22, 2015

Published: March 25, 2015

Copyright: © 2015 El Assar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Funding: The present work was funded by grants from the Ministerio de Economía y Competitividad and cofunded by Fondos FEDER (Instituto de Salud Carlos III, PI10/02781, PI11/01068, RETICEF RD12/0043), Spanish Government, and by Fundación Mutua Madrileña (AP/103152012). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

RESEARCH ARTICLE

Differential Effect of Amylin on Endothelial-Dependent Vasodilation in Mesenteric Arteries from Control and Insulin Resistant Rats

Mariam El Assar¹, Javier Angulo², Marta Santos-Ruiz³, Paola Moreno⁴, Anna Novials⁵, María Luisa Villanueva-Peñacarrillo⁶, Leocadio Rodríguez-Mañas^{1,7*}

1 Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, Spain, 2 Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain, 3 Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, Spain, 4 Digestive Diseases Branch, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America, 5 Diabetes and Obesity Research Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic de Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain, 6 Department of Metabolism, Nutrition & Hormones, Instituto de Investigación Sanitaria (IIS)-Fundación Jiménez Díaz, Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Madrid, Spain, 7 Servicio de Geriátrica del Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, Spain

* leocadio.rodriguez@salud.madrid.org

Abstract

Insulin resistance (IR) is frequently associated with endothelial dysfunction and has been proposed to play a major role in cardiovascular disease (CVD). On the other hand, amylin has long been related to IR. However the role of amylin in the vascular dysfunction associated to IR is not well addressed. Therefore, the aim of the study was to assess the effect of acute treatment with amylin on endothelium-dependent vasodilation of isolated mesenteric arteries from control (CR) and insulin resistant (IRR) rats and to evaluate the possible mechanisms involved. Five week-old male Wistar rats received 20% D-fructose dissolved in drinking water for 8 weeks and were compared with age-matched CR. Plasmatic levels of glucose, insulin and amylin were measured. Mesenteric microvessels were dissected and mounted in wire myographs to evaluate endothelium-dependent vasodilation to acetylcholine. IRR displayed a significant increase in plasmatic levels of glucose, insulin and amylin and reduced endothelium-dependent relaxation when compared to CR. Acute treatment of mesenteric arteries with r-amylin (40 pM) deteriorated endothelium-dependent responses in CR. Amylin-induced reduction of endothelial responses was unaffected by the H₂O₂ scavenger, catalase, but was prevented by the extracellular superoxide scavenger, superoxide dismutase (SOD) or the NADPH oxidase inhibitor (VAS2870). By opposite, amylin failed to further inhibit the impaired relaxation in mesenteric arteries of IRR. SOD, or VAS2870, but not catalase, ameliorated the impairment of endothelium-dependent relaxation in IRR. At concentrations present in insulin resistance conditions, amylin impairs endothelium-dependent vasodilation in microvessels from rats with preserved vascular function

Competing Interests: The authors have declared and low levels of endogenous amylin. In IRR with established endothelial dysfunction and that no competing interests exist. elevated levels of amylin, additional exposure to this peptide has no effect on endothelial vasodilation. Increased superoxide generation through NADPH oxidase activity may be a common link involved in the endothelial dysfunction associated to insulin resistance and to amylin exposure in CR.

Introduction

Amylin, also named islet amyloid polypeptide (IAPP), is a 37 aminoacids peptide that is cosecreted with insulin by the pancreatic β -cells in response to glucose, free fatty acid and food intake [1,2]. Amylin plays a significant role in regulating energy balance by inhibiting food intake and increasing energy expenditure [3,4]. However, infusion of amylin has been shown to cause peripheral insulin resistance in dogs [5], an observation consistent with the fact that transgenic rats for the human amylin gene display glucose dysregulation and insulin resistance [6]. An association between insulin resistance and amylin is supported by studies showing elevated levels of this hormone in patients with impaired glucose regulation [7] and in insulin resistant

elderly women [8]. Furthermore, it has been suggested that the degree of insulin deficiency generally correlates with the degree of amylin deficiency [9].

Impaired endothelial vasodilation is an early event that precedes the clinical manifestations of vascular dysfunction, being the first step to cardiovascular disease (CVD) [10,11]. Insulin resistance has been proposed to play a major role in CVD [12–15]. This is probably related to the impairment of endothelium-dependent vascular function associated with insulin resistance, an alteration documented in different districts of human and animal vasculature [16–23]. In fact, induction of insulin resistance by feeding rats with high fructose results in defective endothelium-dependent relaxation in both macro- and microvessels [24,25], providing a well-characterized model of endothelial dysfunction [26]. Although we have previously proposed that amylin may interfere with endothelial vasodilation in rat arteries [27], the role of amylin in vascular dysfunction associated with insulin resistance has not been addressed.

An increase in reactive oxygen species (ROS) has been implicated as an important mechanism contributing to endothelial dysfunction and associated to insulin resistance related in part to reduced nitric oxide bioavailability [28]. ROS are a heterogeneous chemical class that includes radicals such as superoxide anion, and hydroxyl radicals, as well as, non radicals such as hydrogen peroxide (H₂O₂) [29]. The major sources of ROS in vascular tissue are membrane-associated NADPH oxidases [30]. However, no data are available concerning the role of oxidative stress in the possible impact of acute amylin on endothelial dysfunction.

The aim of the present work was to analyze the effects of amylin on endothelial vasodilation in mesenteric microvessels from control and insulin resistant rats and to determine the possible mechanisms involved.

Methods Animals

Studies were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as adopted and promulgated by National Institutes of Health, and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Hospital Universitario de Getafe. All studies involving animals are reported in accordance with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals [31]. Male Wistar rats from Harlan Laboratories (Barcelona, Spain) were used in all studies. Rats were kept on a standard pellet diet, tap water ad libitum and housed during the experimental period in a room under 12 hour light/dark cycles.

Fructose-fed rats were used as a well characterized model of insulin-resistance (IRR) [32] that has been previously validated by our group [33]. Fructose (20%) dissolved in drinking water was administered to 5 weeks old rats for 8 weeks, at which time the rats developed endothelial dysfunction, manifested by an impaired relaxation to acetylcholine, and insulin resistance as confirmed by the significant increase in the Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA) score when compared to age matched rats [33]. In fact, similar fructose treatment duration and post-natal age for starting the treatment are commonly adopted in studies using this rat model [34–36]. Age-matched rats maintained in the same conditions but not receiving fructose in drinking water were used as controls (CR).

Prior to experimental procedures, overnight-fasted rats were weighed and anesthetized with diazepam (5 mg/kg) and ketamine (90 mg/kg). Then, blood samples were obtained via cardiac

puncture and collected in anticoagulant-free tubes. Sera were obtained by centrifugation while mesenteric fat pad including mesenteric vascular tree was removed in block for isolation of mesenteric microvessels.

Biochemical determinations

Circulating levels of insulin (Merckodia AB, Sweden) and amylin (USCN Life Science Inc, USA) were determined in serum by ELISA, following the manufacturer instructions. Serum glucose concentrations were determined using a colorimetric commercial kit (Biolabo SA, Maizy, France). All samples were assessed in duplicate.

Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) index was calculated as described by Mathews et al. (1985) [37] and normalized to the value obtained in control rats.

Measurement of vascular reactivity in isolated mesenteric arteries

Second order mesenteric branches were mounted on a small vessel Mulvany myograph, connected to a digital recorder (BIOPAC Systems, Inc. Santa Barbara, California, USA) for measuring isometric tension, as previously described [38]. The experiments were performed in Krebs Henseleit Solution, (KHS) which was composed of (mM): NaCl 115, CaCl₂ 2.5, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄·7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25, glucose 11.1, and Na₂EDTA 0.03. The solution was bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ to maintain a pH of 7.4. The segments were subjected to their optimal tension (90% of the tension equivalent to an intramural pressure of 100 mm Hg). After a 30 min equilibration period, vessels were exposed to 125 mM K⁺ (KKHS; equimolar substitution of KCl for NaCl in KHS) to check their functional integrity. After a washout period, segments were contracted with 1–3 μM norepinephrine to obtain 80% of the maximal contraction elicited by KKHS. Relaxations to acetylcholine were subsequently assessed by adding increasing concentrations of the drug at 2-minutes intervals (final bath concentrations 1 nM to 10 μM). In order to evaluate the involvement of ROS generation in endothelial dysfunction related to insulin resistance, the microvascular mesenteric segments were pretreated 30 minutes before ACh administration with the superoxide scavenger, the bovine copper-zinc superoxide dismutase (SOD; 100 U/ml), with the H₂O₂ scavenger catalase (600 U/ml) and with the NADPH oxidase inhibitor (VAS 2870; 10 μM). For determining the role of ROS in the impact caused by amylin on endothelial vasodilation, microarteries were preincubated for 20 minutes with r-amylin, which was added 15 minutes after addition of SOD, catalase or VAS 2870 to the organ bath. Experiments were systematically performed in a paired way, with parallel analysis of control and treated segments from the same rat. Mesenteric arteries were obtained from a total number of 14 CR and 20 IRR.

Chemicals

Drugs used were norepinephrine, acetylcholine chloride, bovine copper zinc CuZn SOD, bovine catalase, VAS 2870 (all obtained from Sigma, St Louis, MO), and synthetic rat amylin (r-amylin) (Bachem, Bubendorf, Switzerland). Drug solutions were made in distilled water, except

norepinephrine, which was prepared in saline (0.9% NaCl) containing ascorbic acid (0.01% wt/vol) to avoid oxidation and VAS2870 which was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; final concentration 0.1%).

Statistical analysis

Results from numerical variables were expressed as mean \pm SE. The number of rats (N) and the number of vascular segments (n) used for relaxation curves are indicated in each graph. Complete concentration-response (relaxation) curves were compared by two-factors ANOVA. Values of pD₂ (which is defined as the negative logarithm of the concentration of ACh required to obtain 50% of maximal relaxation) for each group (CR or IRR) and biochemical data were statistically analyzed by unpaired t-test. In all cases, a probability value of less than 5% was considered significant. Data were analyzed using version 20.0 of SPSS software (SPSS Corp, Chigaco,IL).

Results Characterization of insulin resistant model (hyperglycaemia, hyperinsulinemia)

Administration of D-fructose (20%) to the rats for 8 weeks resulted in non-significant overweight and moderate but significant hyperglycemia when compared to control-matched rats ($p < 0.05$), as indicated in Table 1. A marked hyperinsulinemia was also observed, since serum insulin levels were significantly elevated (more than twofold) above the control in rats with insulin resistance ($p < 0.0001$) (Table 1). The development of insulin resistance in fructose-fed was confirmed by the significant increase in the HOMA score (7.3 ± 1.2 fold increase; $p < 0.0001$) when compared to control rats.

In addition, a more than two fold increase in amylin concentration was observed in serum from fructose-fed IR animals versus controls (45.96 ± 6.32 vs 16.09 ± 2.08 ; $p = 0.0004$) (Fig. 1A).

Table 1. Body weight, fasting glucose and insulin of animals.

| | Control rats (N = 15) | Insulin resistant rats (N = 25) |
|------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Body weight (g) | 343.4 \pm 18.60 | 379.2 \pm 9.87 |
| Fasting glucose (mg/dl) | 65.7 \pm 8.28 | 91.47 \pm 5.39 * |
| Fasting insulin (μ g/l) | 3.08 \pm 0.37 | 8.73 \pm 1.13 *** |

Data are expressed as mean \pm SE. (N) is the number of rats used.

* $p < 0.05$

*** $p < 0.0001$ vs control rats by two-tailed unpaired Student's t-test.

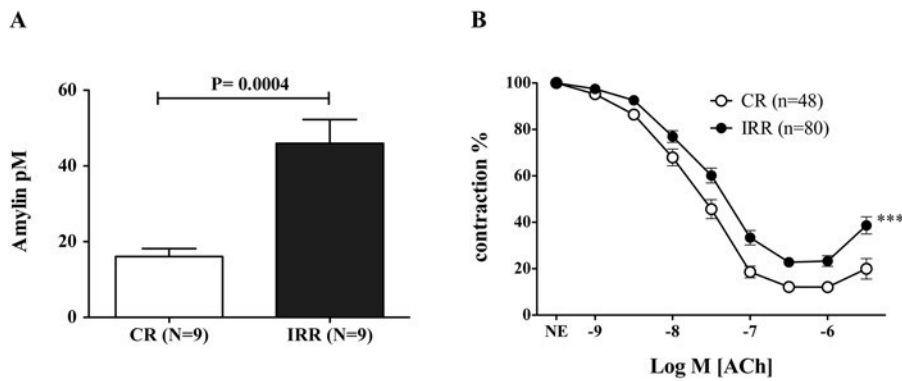


Fig 1. Impaired endothelium-dependent relaxation in insulin resistant rat model and systemic amylin concentration. Panel A shows serum concentrations of amylin (pM) in over-night fasted control (CR) and insulin resistant rats (IRR). Data are expressed as mean±SE. N indicates the number of animals used for determinations. Samples were assessed in duplicate. $p = 0.0004$ versus CR by unpaired t-test. Panel B shows the relaxant response to acetylcholine (ACh; 1 nM to 10 μ M) in mesenteric arterial segments derived from CR and IRR. Data are expressed as mean±SE of the remaining contraction induced by norepinephrine (NE). (n) is the number of vascular segments used for each curve. *** $p < 0.0001$ versus CR by two-factors ANOVA.

Influence of insulin resistance on endothelium-dependent relaxation and amylin levels

Acetylcholine (ACh; 1 nM to 30 μ M) caused endothelium-dependent vasodilatations of rat mesenteric arteries, which were significantly impaired in arteries from IRR when compared to CR (Fig. 1B). The pD_2 values for ACh were 7.58 ± 0.06 and 7.29 ± 0.06 ($p = 0.0035$) in CR and IRR respectively.

Effect of acute amylin treatment on acetylcholine induced relaxation of mesenteric arteries in control and resistant rats

As shown in Fig. 2A, treatment of mesenteric arteries of CR with amylin, at a concentration (40 pM) similar to that observed in insulin resistant rats, significantly impaired endotheliumdependent responses induced by ACh. However, in the IRR group that already shows hyperamylinemia and an impaired vascular response to ACh, the preincubation with the same concentration of amylin (40 pM) did not produce a further reduction of endotheliumdependent vasodilation (Fig. 2B).

Preincubation of mesenteric arteries with amylin (40 pM) did not change the basal tone of vascular segments nor altered the contraction to NE in CR or IRR (99.22 ± 3.56 vs $93.49 \pm 3.71\%$; $96.39 \pm 3.21\%$ vs $96.46 \pm 3.44\%$ for CR and IRR respectively).

NADPH oxidase- derived superoxide contributes to endothelial dysfunction either induced by acute amylin treatment in control rats or by insulin resistance

To evaluate the participation of superoxide anion generation as a mechanism for amylin inhibitory effect on ACh-induced vasodilations, mesenteric arteries were or not preincubated with superoxide scavenger, superoxide dismutase (SOD, 100 U/ml) for 15 minutes before amylin was added. The presence of SOD completely prevented the inhibitory effects of amylin on ACh induced vasodilation in CR (Fig. 3A). In a similar way, to test the possible implication of the non free radical ROS, H_2O_2 , microarteries derived from CR were preincubated with catalase

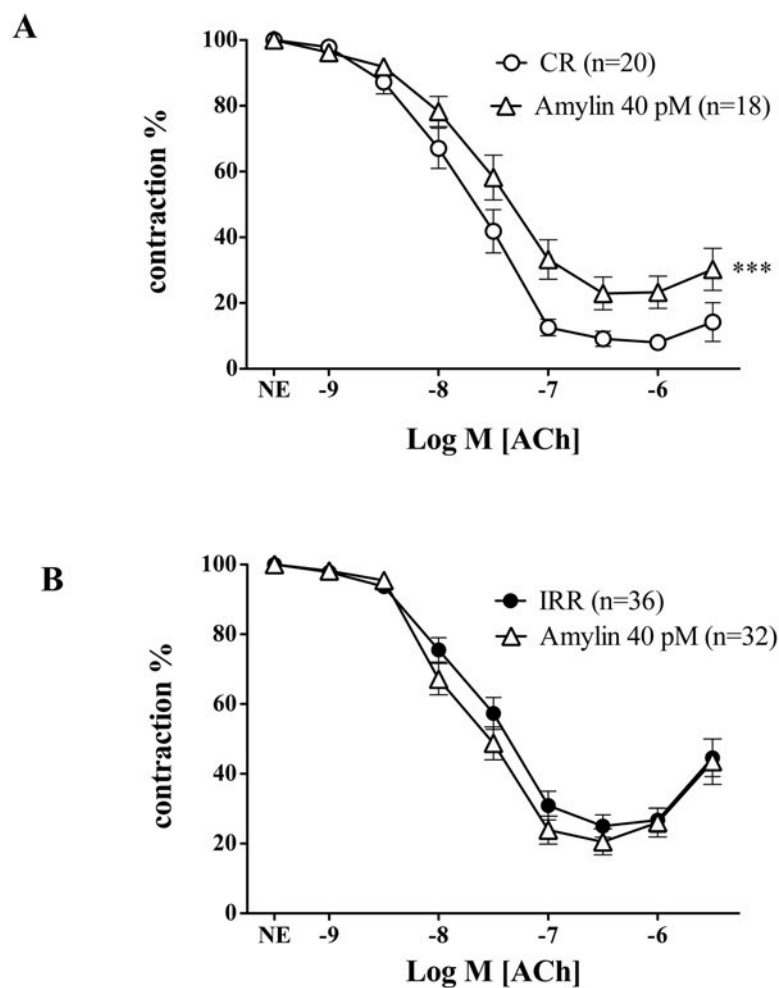


Fig 2. Acute treatment with amylin impairs endothelium-dependent vasodilation only in mesenteric arteries from control rats. Effects of preincubation with r-amylin (40 pM) on endothelium-dependent vasodilation elicited by acetylcholine (ACh; 1 nM to 10 μ M) in isolated

mesenteric arteries from control rats (CR) (A), and from insulin resistant rats (IRR) (B). Data are expressed as mean \pm SE of the remaining contraction induced by norepinephrine (NE). n indicates the number of vascular segments used for determinations. *** Indicates $p < 0.0001$ versus CR by two-factors ANOVA.

(600 U/ml), a scavenger of H₂O₂. Catalase was not able to reverse the impairment of ACh-induced vascular responses caused by amylin acute treatment (Fig. 3B). With respect to the possible sources of superoxide production, the role of NADPH oxidase, was analyzed.

Acute treatment of mesenteric arteries of CR with the NADPH oxidase selective inhibitor, VAS 2870 (10 μ M) for 15 minutes before amylin was added to the organ bath fully prevented the inhibitory effect of amylin on the relaxations induced by ACh (Fig. 3C).

None of these treatments modified the vasodilation induced by ACh in mesenteric arteries of CR (pD₂: 7.41 \pm 0.15 vs. 7.56 \pm 0.15; 8.03 \pm 0.20 vs. 7.82 \pm 0.15) for SOD, and VAS 2870, respectively) (Fig. 4A and 4B).

In mesenteric arteries derived from IRR, while treatment with catalase did not modify ACh-induced vasodilation (Fig. 5B), superoxide scavenging with the extracellular detoxifying enzyme SOD (100 U/ml) significantly improved responses elicited by ACh (Fig. 5A). In microarteries precontracted with NE, the pretreatment with VAS 2870 also ameliorated the

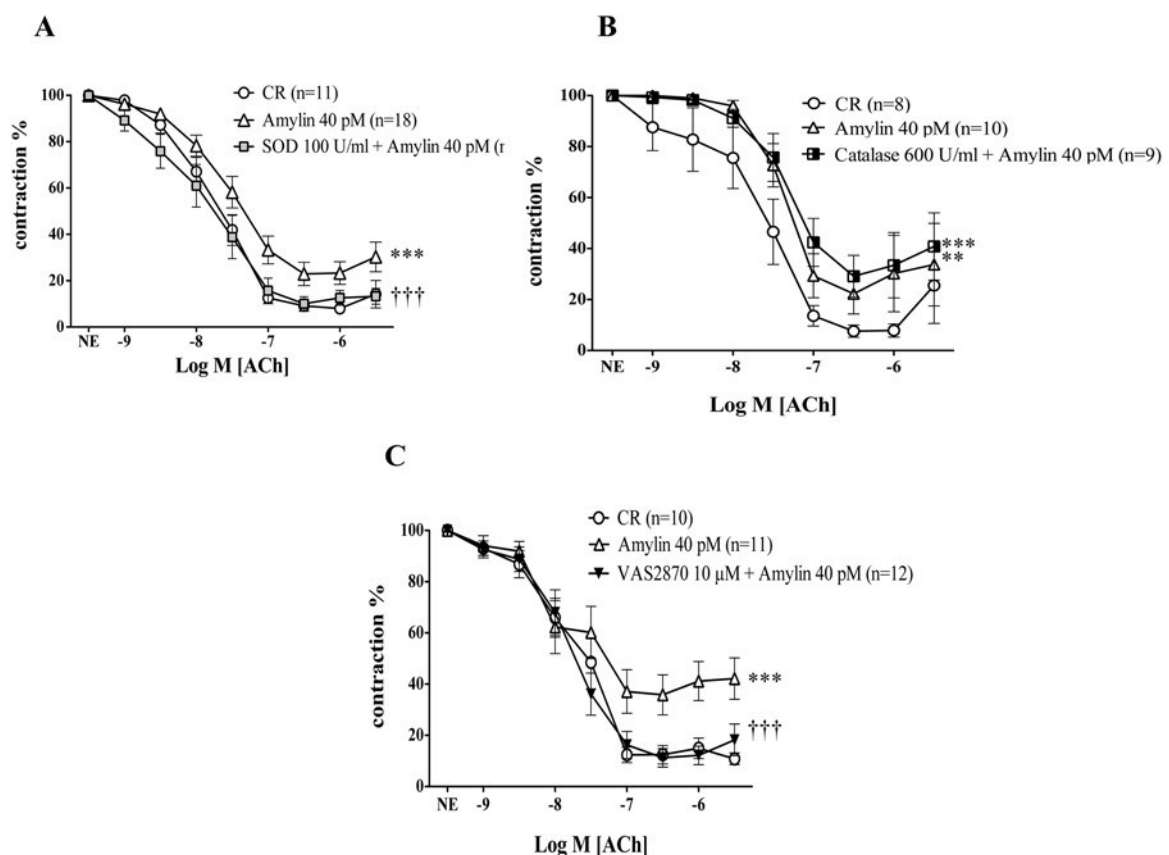


Fig 3. NADPH derived superoxide is involved in the endothelial dysfunction induced by acute amylin treatment in mesenteric arteries of control rats. The impact of the superoxide scavenger,

superoxide dismutase (SOD, 100 U/ml) (A), and the hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenger (catalase, 600 U/ml) (B) on the effects of acute amylin treatment (40 pM) on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh; 1 nM to 10 μ M) in isolated mesenteric arteries from control rats (CR) is shown. The influence of the NADPH oxidase inhibitor, VAS 2870 (10 μ M) on relaxant response elicited by acetylcholine (ACh; 1 nM to 10 μ M) in mesenteric arteries from CR exposed to acute amylin (Panel C) is also reported. (n) Indicates the number of vascular segments used for determinations. Data are expressed as mean \pm SE of the remaining contraction induced by norepinephrine (NE). ** Indicates $p < 0.001$; *** Indicates $p < 0.0001$ versus CR, ††† indicates $p < 0.0001$ versus CR plus amylin (40 pM) by two-factors ANOVA test.

endothelium-dependent vasodilation induced by ACh (Fig. 5C). By opposite, the improving effect induced by SOD, or VAS 2870 was not altered by the additional presence of amylin (40 pM) in mesenteric arteries from IRR (data not shown).

Discussion

The present results suggest that elevated levels of amylin could contribute to the impairment of endothelium-dependent vasodilation observed in insulin resistance through generation of superoxide anions. This is based on the fact that the impairment of endothelial vasodilation in mesenteric microarteries from insulin resistant rats is associated with increased concentration of serum amylin. When similar concentrations of this peptide are added to vessels from control rats, defective endothelium-dependent vasodilation develops but not when added to the vessels from insulin resistant rats. Amylin-induced effects in arteries from control rats are reversed by detoxifying superoxide anions or by inhibiting superoxide production by NADPH oxidase. Improvement of endothelial vasodilation in vessels from insulin resistant rats is accomplished by scavenging superoxide even in the absence of exogenously added amylin.

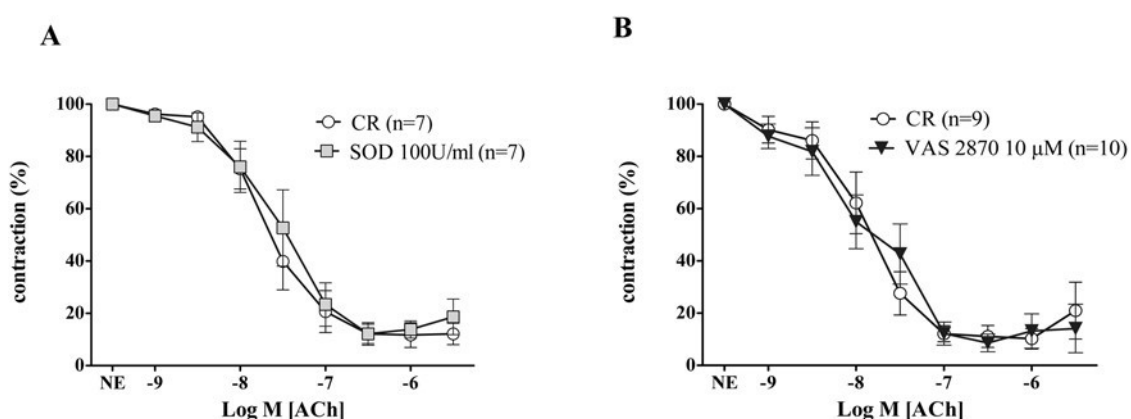


Fig 4. Superoxide scavenging and NADPH inhibition failed to modify endothelium-dependent vasodilation elicited by acetylcholine in control rats in the absence of amylin. The impact of the superoxide scavenger, superoxide dismutase (SOD, 100 U/ml) (A), and the NADPH oxidase inhibitor (VAS 2870, 10 μ M) (B) on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh; 1 nM to 10 μ M) in isolated mesenteric arteries from control rats (CR) is reported. (n)

Indicates the number of vascular segments used for determinations. Data are expressed as mean \pm SE of the remaining contraction induced by norepinephrine (NE).

Fructose-fed rats represent a well- characterized model of insulin resistance [33,26], which is confirmed by the presence of mild hyperglycemia and marked hyperinsulinemia in our experimental setting. Furthermore, HOMA score, commonly used as an index of insulin resistance, was notably increased in 8 week fructose fed animals when compared to control matched rats. We also found more than twofold increase in serum amylin concentrations in insulin resistant rats. This finding is consistent with the increased levels of amylin detected in humans under insulin resistance conditions such as impaired glucose regulation, type 2 diabetes [7] and polycystic ovary syndrome [39]. The alteration of metabolic hormones levels is associated with a significant impairment of endothelium-dependent relaxation in mesenteric arteries from these rats when compared to control, non-insulin resistant, rats. This is in agreement with previous studies reporting reduced endothelium-dependent vasodilation in fructose-fed rats and other rat models of insulin resistance [24,25,40].

To ascertain if high concentrations of amylin could contribute to the endothelial impairment observed in IRR, mesenteric arteries from control rats were exposed to amylin at concentrations (40 pM) similar to those reached in serum from IRR (~46 pM). At such concentration, amylin caused an impairment of endothelial vasodilation, suggesting that the presence of high levels of amylin could account for the defective endothelial vasodilation in microvasculature of IRR. This observation is consistent with previous results showing the capacity of exogenously added amylin to impair endothelium-dependent relaxation of rat aorta and mesenteric arteries [27]. Former reports had suggested a vasodilatory capacity of amylin but these studies were carried out with concentrations of amylin largely above those achievable in plasma, even in insulin resistance, an effect related to its agonistic activity on calcitonin generelated peptide (CGRP) at such elevated concentrations [41,42], that does not seem to be mediated by NO or the endothelium [43].

The lack of further impairment of endothelium-dependent vasodilation in mesenteric arteries from IRR when exposed to 40 pM amylin supports the hypothesis of a contribution of increased amylin to endothelial impairment in insulin resistance. In other words, if high amylin is interfering with endothelial vasodilation in these animals, the addition of exogenous amylin does not exert additional effects, as it could be expected if a different mechanism was responsible.

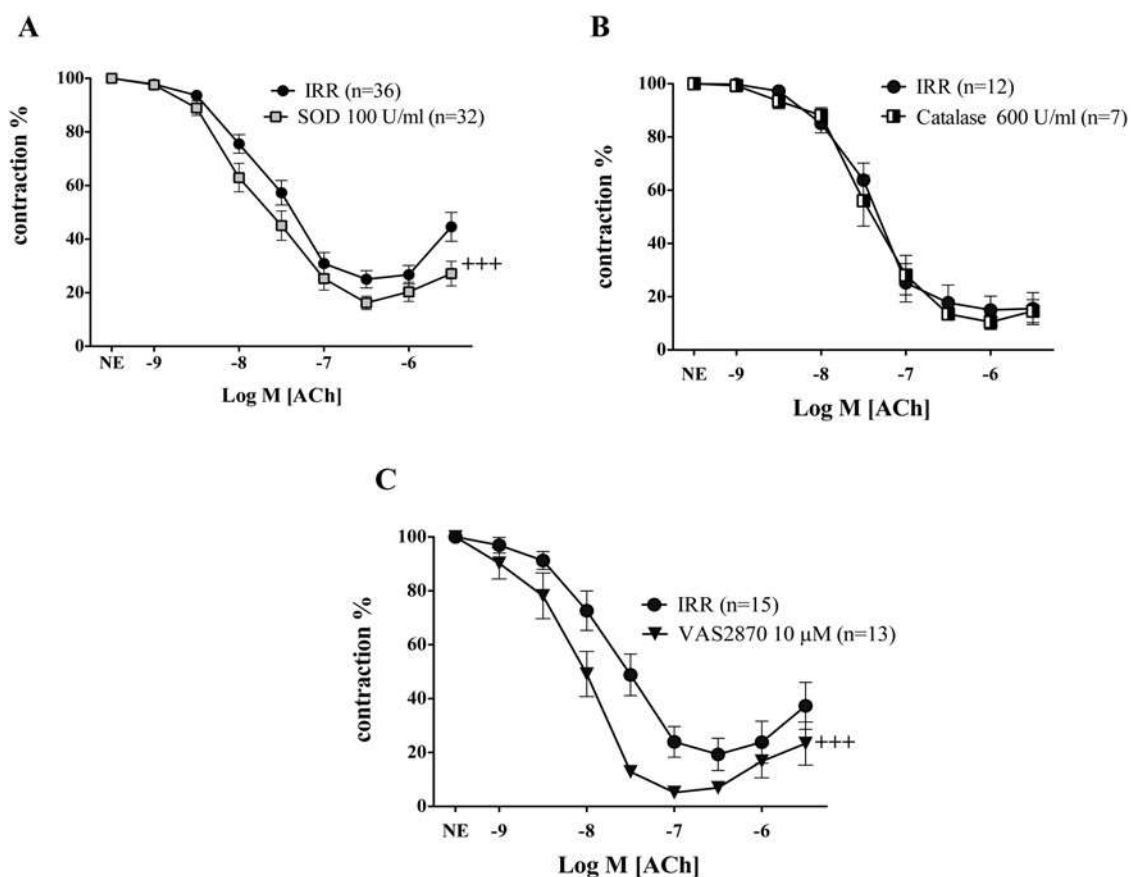


Fig 5. NADPH is the principal source of superoxide anion involved in the endothelial dysfunction associated to insulin resistance. The improving effects of preincubation with the superoxide scavenger, superoxide dismutase (SOD, 100 U/ml) (A) or with the NADPH oxidase inhibitor (VAS 2870; 10 μ M) (C) on vasodilation elicited by acetylcholine (ACh; 1 nM to 10 μ M) in mesenteric arteries of insulin resistant rats (IRR). Panel B shows the lack of effect obtained when vessels of IRR rats were preincubated with the hydrogen peroxide (H_2O_2) scavenger (catalase, 600 U/ml). (n) Indicates the number of vascular segments used for determinations. Data are expressed as mean \pm SE of the remaining contraction induced by norepinephrine (NE). +++ Indicates $p < 0.0001$ versus IRR by two-factors ANOVA test.

It has been proposed that amylin causes cardiac dysfunction in insulin resistance as suggested by the increased deposition of amylin in failing hearts from obese and type 2 diabetic patients [44]. This association is supported by the fact that overexpression of human amylin causes cardiac dysfunction in rats through deposition of amylin oligomers [44]. Although we cannot entirely discard the formation of oligomers of amylin when added to microvessels in our study, this mechanism is not likely responsible for the impairment of endothelial vasodilation driven by amylin since we have used rat amylin that is considered not to be amyloidogenic [45].

The deleterious effect of amylin on endothelial vasodilation of rat mesenteric arteries probably involves generation of superoxide anions by NADPH oxidase, as suggested by the preventive actions of the extracellular superoxide scavenger, SOD and the NADPH oxidase inhibitor, VAS2870. The possible implication of the non free radical ROS, H_2O_2 , in the impairment of endothelial vasodilation induced by amylin is unlikely since catalase, that breakdowns H_2O_2 , had no effect on defective vasodilation caused by amylin. Therefore, this observation reinforces

our conclusion with respect to superoxide anion generated by NADPH oxidase as the principal culprit of endothelial dysfunction associated to amylin acute treatment. Although this finding has been obtained with non-amyloidogenic rat amylin, some evidences suggest an association between deposition of amyloidogenic human amylin and increased oxidative stress levels.

Indeed, inhibition of amyloid formation prevented the induction of oxidative stress in human islet amyloid polypeptide transgenic mouse islets in culture [46].

It is of importance to point out that there are no data in literature providing the possible mechanisms underlying the defective responses induced by acute amylin treatment in isolated mesenteric arteries derived from animals with preserved endothelial function.

Similarly to the mechanism driven by acute amylin in CR, superoxide generation rather than H_2O_2 is involved in the impairment of endothelial vasodilation in IRR since the treatment of mesenteric arteries from these animals with SOD, significantly improved endothelial responses while catalase failed to do so. Previous data in mild pre-diabetic insulin resistant mice proposed that blunted vasorelaxation responses to ACh arise secondary to an increase in endothelial cell production of ROS. Furthermore, the impaired endothelium mediated relaxation of aortic segments in these animals was restored by a SOD mimetic [47].

In vascular tissue, the membrane-associated NADPH oxidase accounts for the majority of superoxide generation favoring the production of ROS [30]. In our experimental model of insulin resistance, VAS 2870 preincubation improved ACh-induced vasodilation in mesenteric arteries of fructose fed rats. Although limited evidences suggests off-target activities by the NADPH oxidase inhibitor, VAS2870 [48], it should be noted that most of scientific evidences point to VAS2870 as displaying consistent specificity to inhibit NADPH oxidase [49,50]. Thus, VAS2870-induced effects are consistent with available data in which an improvement of endothelial dysfunction was observed by specifically targeting NADPH oxidase in insulin resistant mice [51]. Taken as a whole, all these facts suggest that a common mechanism contributes to endothelial dysfunction caused by insulin resistance in mesenteric microvessels and the endothelial dysfunction induced by increasing concentrations of amylin to pathological levels in mesenteric arteries from healthy rats. In fact, defective NO-mediated responses are responsible for the impairment of endothelium-dependent relaxation caused by amylin in aorta of CR [27], a mechanism also involved in the endothelial dysfunction detected in aorta from IRR [33]. This suggests that reduction of NO availability caused by NADPH oxidase stimulation by amylin excess or insulin resistance could compromise endothelial vasodilation in rat vasculature.

In conclusion, amylin impairs vasorelaxant responses in isolated mesenteric arteries only when endothelial function is preserved and endogenous amylin is not elevated. In the presence of insulin resistance, characterized of defective relaxant response to acetylcholine and hyperamylinemia, exogenously added amylin has no effect. One potential mechanism implicated in the endothelial dysfunction associated to amylin increase is related to superoxide generation by means of the NADPH oxidase system a mechanism also contributing to endothelial dysfunction in insulin resistance and hyperamylinemic conditions.

Acknowledgments

We are grateful to Alberto Sánchez Ferrer for his technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MEA LRM. Performed the experiments: MEA MSR PM. Analyzed the data: AN JA MLVP. Wrote the paper: MEA JA. Contributed to and have reviewed the final manuscript: MEA JA MSR PM AN MLVP LRM.

References

1. Butler PC, Chou J, Carter WB, Wang YN, Bu BH, Chang D, et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. *Diabetes*. 1990; 39: 752–756. PMID: 2189768
2. Mitsukawa T, Takemura J, Asai J, Nakazato M, Kangawa K, Matsuo H, et al. Islet amyloid polypeptide response to glucose, insulin, and somatostatin analogue administration. *Diabetes*. 1990; 39: 639–642. PMID: 1970540
3. Lutz TA. Amylinergic control of food intake. *Physiol Behav*. 2006; 89: 465–471. PMID: 16697020
4. Lutz TA. The role of amylin in the control of energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010; 298: R1475–1484. doi: 10.1152/ajpregu.00703.2009 PMID: 20357016
5. Sowa R, Sanke T, Hirayama J, Tabata H, Furuta H, Nishimura S, et al. Islet amyloid polypeptide amide causes peripheral insulin resistance in vivo in dogs. *Diabetologia*. 1990; 33: 118–120. PMID: 2184060
6. Matveyenko AV, Butler PC. Beta-cell deficit due to increased apoptosis in the human islet amyloid polypeptide transgenic (HIP) rat recapitulates the metabolic defects present in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55: 2106–2114. PMID: 16804082
7. Zheng X, Ren W, Zhang S, Liu J, Li S, Li J, et al. Serum levels of proamylin and amylin in normal subjects and patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2010; 47: 265–270. doi: 10.1007/s00592-010-0201-9 PMID: 20509034
8. Banks WA, Willoughby LM, Thomas DR, Morley JE. Insulin resistance syndrome in the elderly: assessment of functional, biochemical, metabolic, and inflammatory status. *Diabetes Care*. 2007; 30: 2369–2373. PMID: 17536070
9. Young A. Tissue expression and secretion of amylin. *Adv Pharmacol*. 2005; 52: 19–45. PMID: 16492539
10. Scuteri A, Lakatta EG. Bringing prevention in geriatrics: evidences from cardiovascular medicine supporting the new challenge. *Exp Gerontol*. 2013; 48: 64–68. doi: 10.1016/j.exger.2012.02.009 PMID: 22406133
11. Seals DR, Moreau KL, Gates PE, Eskurza I. Modulatory influences on ageing of the vasculature in healthy humans. *Exp Gerontol*. 2006; 41: 501–507. PMID: 16537099
12. Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2002; 25: 1177–1184. PMID: 12087016
13. Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013; 14: 5–12. doi: 10.1007/s11154-012-9229-1 PMID: 23306778
14. Reaven G. Insulin resistance and coronary heart disease in nondiabetic individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 1754–1759. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241885 PMID: 22815340

15. Thacker EL, Psaty BM, McKnight B, Heckbert SR, Longstreth WT, Mukamal KJ Jr, et al. Fasting and post-glucose load measures of insulin resistance and risk of ischemic stroke in older adults. *Stroke*. 2011; 42: 3347–3351. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.620773 PMID: 21998054
16. Fujii N, Tsuchihashi K, Sasao H, Eguchi M, Miurakami H, Hase M, et al. Insulin resistance functionally limits endothelium-dependent coronary vasodilation in nondiabetic patients. *Heart Vessels*. 2008; 23: 9–15. doi: 10.1007/s00380-007-1002-0 PMID: 18273540
17. Kearney MT, Duncan ER, Kahn M, Wheatcroft SB. Insulin resistance and endothelial cell dysfunction: studies in mammalian models. *Exp Physiol*. 2008; 93: 158–163. PMID: 17933859
18. Lteif AA, Han K, Mather KJ. Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation*. 2005; 112: 32–38. PMID: 15983246
19. Meyers MR, Gokce N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007; 14: 365–369. PMID: 17940464
20. Schelbert HR. Coronary circulatory function abnormalities in insulin resistance: insights from positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53: S3–8. doi: 10.1016/j.jacc.2008.09.053 PMID: 19179215
21. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996; 97: 2601–2610. PMID: 8647954
22. Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y, Harano Y. Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 76: 12–17. PMID: 17007957
23. Vazzana N, Santilli F, Sestili S, Cuccurullo C, Davi G. Determinants of increased cardiovascular disease in obesity and metabolic syndrome. *Curr Med Chem*. 2011; 18: 5267–5280. PMID: 22087824
24. Katakam PV, Ujhelyi MR, Miller AW. EDHF-mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34: 461–467. PMID: 10471008
25. Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, et al. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂ imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*. 1999; 48: 2437–2445. PMID: 10580434
26. Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2009; 332: 145–159. doi: 10.1007/s11010-0090184-4 PMID: 19536638
27. Novials A, Rodriguez-Mañas L, Chico A, El Assar M, Casas S, Gomis R. Amylin and hypertension: association of an amylin-G132A gene mutation and hypertension in humans and amylin-induced endothelium dysfunction in rats. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 1446–1450. PMID: 17213278
28. El Assar M, Ruiz de Adana JC, Angulo J, Pindado Martinez ML, Hernandez Matias A, Rodriguez-Mañas L. Preserved endothelial function in human obesity in the absence of insulin resistance. *J Transl Med*. 2013; 11: 263. doi: 10.1186/1479-5876-11-263 PMID: 24138787
29. Vara D, Pula G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Curr Mol Med*. 2014; 14: 1103–1125. PMID: 24894168

30. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P, et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 333–339. PMID: 16293794
31. McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 2010; 160: 1573–1576. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00873.x PMID: 20649560
32. Villanueva-Penacarrillo ML, Puente J, Redondo A, Clemente F, Valverde I. Effect of GLP-1 treatment on GLUT2 and GLUT4 expression in type 1 and type 2 rat diabetic models. *Endocrine.* 2001; 15: 241–248. PMID: 11720253
33. El Assar M, Sanchez-Puelles JM, Royo I, Lopez-Hernandez E, Sanchez-Ferrer A, Acena JL, et al. FM19G11 reverses endothelial dysfunction in rat and human arteries through stimulation of the PI3K/ Akt/eNOS pathway, independently of mTOR/HIF-1alpha activation. *Br J Pharmacol.* 2014 Nov 3. doi: 10.1111/bph.12993
34. Cancelas J, Prieto PG, Garcia-Arevalo M, Sancho V, Villanueva-Penacarrillo ML, Malaisse WJ, et al. Induction and reversibility of insulin resistance in rats exposed to exogenous D-fructose. *Horm Metab Res.* 2008; 40: 459–466. doi: 10.1055/s-2008-1065318 PMID: 18393174
35. Moreno P, Nuche-Berenguer B, Gutierrez-Rojas I, Acitores A, Sancho V, Valverde I, et al. Normalizing action of exendin-4 and GLP-1 in the glucose metabolism of extrapancreatic tissues in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *J Mol Endocrinol.* 2012; 48: 37–47. doi: 10.1530/JME-11-0127 PMID: 22065862
36. Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapia S, Caeiro JR, Cancelas J, et al. Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states. *Calcif Tissue Int.* 2009; 84: 453–461. doi: 10.1007/s00223-009-9220-3 PMID: 19219381
37. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28: 412–419. PMID: 3899825
38. Rodriguez-Mañas L, Angulo J, Vallejo S, Peiro C, Sanchez-Ferrer A, Cercas E, et al. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia.* 2003; 46: 556–566. PMID: 12739028
39. James S, Morales J, Nagamani M. Increased secretion of amylin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010; 94: 211–215. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.086 PMID: 19338997
40. Young EJ, Hill MA, Wiehler WB, Triggle CR, Reid JJ. Reduced EDHF responses and connexin activity in mesenteric arteries from the insulin-resistant obese Zucker rat. *Diabetologia.* 2008; 51: 872–881. doi: 10.1007/s00125-008-0934-y PMID: 18324386
41. Golpon HA, Puechner A, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO. Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7–36)amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat. *Regul Pept.* 2001; 102: 81–86. PMID: 11730979
42. Hasbak P, Sams A, Schifter S, Longmore J, Edvinsson L. CGRP receptors mediating CGRP-, adrenomedullin- and amylin-induced relaxation in porcine coronary arteries. Characterization with 'Compound

- 1' (WO98/11128), a non-peptide antagonist. *Br J Pharmacol.* 2001; 133: 1405–1413. PMID: 11498528
43. Luk'yantseva GV, Sergeev IY, Kopylova GN, Samonina GE, German SV. Effect of amylin on the tone of rat aorta ring preparation. *Bull Exp Biol Med.* 2001; 132: 932–934. PMID: 11782784
 44. Despa S, Margulies KB, Chen L, Knowlton AA, Havel PJ, Taegtmeier H, et al. Hyperamylinemia contributes to cardiac dysfunction in obesity and diabetes: a study in humans and rats. *Circ Res.* 2012; 110: 598–608. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.258285 PMID: 22275486
 45. Liang G, Zhao J, Yu X, Zheng J. Comparative molecular dynamics study of human islet amyloid polypeptide (IAPP) and rat IAPP oligomers. *Biochemistry.* 2013; 52: 1089–1100. doi: 10.1021/bi301525e PMID: 23331123
 46. Zraika S, Hull RL, Udayasankar J, Aston-Mourney K, Subramanian SL, Kisilevsky R, et al. Oxidative stress is induced by islet amyloid formation and time-dependently mediates amyloid-induced beta cell apoptosis. *Diabetologia.* 2009; 52: 626–635. doi: 10.1007/s00125-008-1255-x PMID: 19148619
 47. Duncan ER, Walker SJ, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Li JM, Shah AM, et al. Accelerated endothelial dysfunction in mild prediabetic insulin resistance: the early role of reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293: E1311–1319. PMID: 17711985
 48. Sun QA, Hess DT, Wang B, Miyagi M, Stamler JS. Off-target thiol alkylation by the NADPH oxidase inhibitor 3-benzyl-7-(2-benzoxazolyl)thio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidine (VAS2870). *Free Radic Biol Med.* 2012; 52: 1897–1902. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.046 PMID: 22406319
 49. Nikiforova AB, Fadeev RS, Kruglov AG. Rapid fluorescent visualization of multiple NAD(P)H oxidoreductases in homogenate, permeabilized cells, and tissue slices. *Anal Biochem.* 2013; 440: 189–196. doi: 10.1016/j.ab.2013.05.029 PMID: 23747529
 50. Schramm A, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol.* 2012; 56: 216–231. doi: 10.1016/j.vph.2012.02.012 PMID: 22405985
 51. Sukumar P, Viswambharan H, Imrie H, Cubbon RM, Yuldasheva N, Gage M, et al. Nox2 NADPH oxidase has a critical role in insulin resistance-related endothelial cell dysfunction. *Diabetes.* 2013; 62: 2130–2134. doi: 10.2337/db12-1294 PMID: 23349484

ANEXO 2

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) elevation and arginase up-regulation contribute to endothelial dysfunction related to insulin resistance in rats and morbidly obese humans

Mariam El Assar¹, Javier Angulo², Marta Santos-Ruiz³, Juan Carlos Ruiz de Adana⁴, María Luz Pindado⁵,

Alberto Sanchez-Ferrer¹, Alberto Hernandez⁴ and Leocadio Rodríguez-Manas^{1,6}

¹*Instituto de Investigacion Sanitaria de Getafe, Getafe, Madrid, Spain*

²*Unidad de Investigacion Cardiovascular (IRYCIS/UFV), Hospital Universitario Ramon y Cajal, Madrid, Spain* ³*Servicio de Analisis Clínicos*

⁴*Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo*

⁵*Servicio de Anestesiología y Reanimación*

⁶*Servicio de Geriátrica, Hospital Universitario de Getafe, Getafe, Madrid, Spain*

Keypoints

The presence of insulin resistance (IR) is determinant for endothelial dysfunction associated with obesity.

Although recent studies have implicated the involvement of mitochondrial superoxide and inflammation in the defective nitric oxide (NO)-mediated responses and subsequent endothelial dysfunction in IR, other mechanisms could compromise this pathway.

In the present study, we assessed the role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and arginase with respect to IR-induced impairment of endothelium-dependent vasodilatation in human morbid obesity and in a non-obese rat model of IR.

We show that both increased ADMA and up-regulated arginase are determinant factors in the alteration of the L-arginine/NO pathway associated with IR in both models and also that acute treatment of arteries with arginase inhibitor or with L-arginine significantly alleviate endothelial dysfunction.

These results help to expand our knowledge regarding the mechanisms of endothelial dysfunction that are related to obesity and IR and establish potential therapeutic targets for intervention.

Abstract Insulin resistance (IR) is determinant for endothelial dysfunction in human obesity. Although we have previously reported the involvement of mitochondrial superoxide and inflammation, other mechanisms could compromise NO-mediated responses in IR. We evaluated the role of the endogenous NOS inhibitor asymmetric dimethylarginine (ADMA) and arginase with respect to IR-induced impairment of L-arginine/NO-mediated vasodilatation in human morbid obesity and in a non-obese rat model of IR. Bradykinin-induced vasodilatation was evaluated in microarteries derived from insulin-resistant morbidly obese (IR-MO) and non-insulin-resistant MO (NIR-MO) subjects. Defective endothelial vasodilatation in IR-MO was improved by L-arginine supplementation. Increased levels of ADMA were detected in serum and adipose tissue from IR-MO. Serum ADMA positively correlated with IR score and negatively with pD₂ for bradykinin. Gene expression determination by RT-PCR revealed not only the decreased expression of ADMA degrading enzyme dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)1/2 in IR-MO microarteries, but also increased expression of arginase-2. Arginase inhibition improved endothelial vasodilatation in IR-MO. Analysis of endothelial vasodilatation in a non-obese IR model (fructose-fed rat) confirmed an elevation of circulating and aortic ADMA concentrations, as well as reduced DDAH aortic content and increased aortic arginase activity in IR. Improvement of endothelial vasodilatation in IR rats by L-arginine supplementation and arginase inhibition provided functional corroboration. These results demonstrate that increased ADMA and up-regulated arginase contribute to endothelial dysfunction as determined by the presence of IR in human obesity, most probably by compromising arginine availability. The results provide novel insights regarding the mechanisms of endothelial dysfunction related to obesity and IR and establish potential therapeutic targets for intervention.

(Received 6 November 2015; accepted after revision 18 January 2016; first published online 3 February 2016) **Corresponding author** L. Rodríguez-Manas: Servicio de Geriatría del Hospital Universitario de Getafe, Ctra de Toledo km 12,500, 28905 Getafe, Spain. Email: leocadio.rodriguez@salud.madrid.org

Abbreviations ADMA, asymmetric dimethylarginine; CR, control rat; CRP, C-reactive protein; CVD, cardiovascular disease; DDAH, dimethylarginine dimethylaminohydrolase; eNOS, endothelial NO synthase; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IR, insulin resistance; IRR, insulin-resistant rat; MO, morbidly obese; NIR, non-insulin-resistant; nor-NOHA, N_ω-hydroxyl-nor-L-arginine; SNP, sodium nitroprusside.

Introduction

Obesity, one of the major public health problems, is an important risk factor for the development of cardiovascular disease (CVD) (Burke et al. 2008). Insulin resistance (IR) has been proposed as the link between obesity and CVD (Reaven, 2011). Indeed, we have recently revealed the determinant role of IR in the presence of endothelial dysfunction, as manifested by impaired endothelium-dependent vasodilatation, in morbidly obese (MO) individuals (El Assar et al. 2013).

IR is a pathological situation that, in addition to predicting type 2 diabetes, represents an important risk factor for CVD (Reaven, 2012). This is probably related to the impact of IR on endothelial vasodilatation because a defective response has been detected in different vascular beds in humans with this condition (Suzuki et al. 2007; Fujii et al. 2008). Furthermore, in animal models, the induction of IR by feeding rats with high levels of fructose results in impaired endothelium-dependent relaxation in both macro- and microvessels (Katakam et al. 1999; El Assar et al. 2015c), providing a well-characterized model of endothelial dysfunction.

We have previously shown that, among the potential mechanisms explaining the endothelial dysfunction determined by the presence of IR in morbid obesity, the impairment of nitric oxide (NO)-mediated vasodilatation is highly relevant. We have demonstrated the involvement of both mitochondria-generated superoxide anion and inflammation in the

defective NO-mediated responses associated with the insulin-resistant condition (El Assar et al. 2013; El Assar et al. 2015a). However, it is noteworthy that, in addition to the above mentioned mechanisms, other mechanisms may compromise NO-responses and therefore remain to be explored.

The endothelium-derived NO is produced from the substrate L-arginine by endothelial NO synthase (eNOS).

Even though L-arginine is the main precursor of NO, the regulation of NO production is multifactorial and is not limited by circulating L-arginine but, instead, by intracellular substrate and co-factor availability, NOS activation, and NOS inhibition by endogenous analogues of L-arginine, such as asymmetric dimethylarginine (ADMA) (Vallance et al. 1992). An increase in ADMA could lead to impaired NO bioavailability and vascular dysfunction (Anderssohn et al. 2010). In line with this, evidence has been obtained showing increased ADMA levels in different clinical settings associated with the appearance and progression of vascular disease, such as in essential hypertension, diabetes mellitus and insulin resistance (IR) (Stuhlinger et al. 2002; Das et al. 2011). Moreover, the endogenous production of ADMA has been proposed as an explanation for the 'L-arginine paradox'. Indeed, exogenous supplementation of L-arginine was observed to increase NO production both in vivo and in vitro. This occurs despite the presence of a baseline concentration of L-arginine sufficient to saturate NOS (Boger, 2004). Therefore, the presence of an endogenous competitive

antagonist, such as ADMA, at the active site of the enzyme might provide a satisfactory explanation for this phenomenon (Caplin & Leiper, 2012).

The vast majority of ADMA is removed by enzymatic degradation by dimethylarginine-dimethylaminohydrolase (DDAH). The two DDAH isoforms, DDAH1 and DDAH2, share similar enzymatic activity but have distinct vascular distributions (Leiper et al. 1999). Nonetheless, heterozygous deletion studies suggest that DDAH1 is the primary isoform responsible for ADMA degradation in the vascular endothelium and it appears to play a role in endothelial function in vivo (Hu et al. 2009). A recent study showed that insulin-resistant rats (IRRs) exhibit not only a reduction in DDAH activity and aortic expression of DDAH1, but also an increase in plasma ADMA levels (Chen et al. 2012). Accordingly, elevated circulating ADMA concentrations were shown to be associated with IR in patients under different conditions (Perticone et al. 2010), including obesity (Marliss et al. 2006). However, the relationship between ADMA and endothelial function in subjects with IR is not completely established. An inverse association between forearm blood flow and serum ADMA levels has been reported in both hypertensive subjects and newly diagnosed type 2 diabetic patients (Perticone et al. 2005; Sciacqua et al. 2012), whereas no significant correlation between ADMA and NO production has been detected in other studies (Kocak et al. 2011; Siervo & Bluck, 2012). Furthermore, the improvement of endothelial function after weight loss in obese

subjects appears to be independent of ADMA reduction (Rudofsky et al. 2011).

By contrast, a reduced availability of L-arginine for NO synthesis is determined, among other factors, by the activity of alternative pathways of L-arginine metabolism, such as the action of arginases. Arginase, including type 1 and type 2 isoforms, competes directly with eNOS for L-arginine. Both arginase isoforms are expressed in endothelial cells and display similar roles with respect to the negative regulation of eNOS function (Yang & Ming, 2013). Therefore, an increase in arginase activity can decrease the tissue/cellular content of L-arginine available to eNOS, thus limiting NO production (Durante et al. 2007). In this sense, sustained arginase inhibition ameliorates hypertension in fructose-fed rats via its direct effect on endothelium-dependent relaxation and NO generation (El-Bassossy et al. 2013). Furthermore, recent studies demonstrate that genetic ablation of arginase-2 in mice fed a high-fat diet reduces atherosclerosis and improves insulin sensitivity (Ming et al. 2012), and also preserves the endothelium-dependent relaxation of the aorta (Yu et al. 2014).

The present study aimed to test the hypothesis that IR results in elevated ADMA concentrations and/or increased arginase activity/expression. Both alterations will compromise the L-arginine/NO pathway, subsequently leading to impaired endothelial vasodilatation. We assessed this hypothesis in human obese subjects with or without IR in a non-obese rat model of IR by determining the presence of ADMA/arginase enhancement by IR, as

well as by evaluating the effects of arginine supplementation and arginase inhibition on endothelial vasodilatation in arteries from humans and rats with IR.

Methods

Ethical approval

The study conducted in humans was approved by both the Ethics Committee and Research Committee of the Hospital Universitario de Getafe. Studies conducted in animals were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as adopted and promulgated by National Institutes of Health, and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Hospital Universitario de Getafe

Study population

The present study included 41 MO subjects with a body mass index 40 kg m^{-2} and aged between 26 and 65 years, who underwent bariatric surgery in the Hospital Universitario de Getafe with mixed techniques combining Roux-en-Y gastric bypass, vertical sleeve gastrectomy and adjustable gastric banding. Subjects with history or clinical evidence of CVD (congestive heart failure; cardiac and/or cerebrovascular ischaemic disease) were excluded, although this did not include those with cardiovascular risk factors such as type 2 diabetes,

hypertension, dyslipidaemia or smoking. In addition, subjects with pre-existing kidney and liver failure, pregnancy, use of corticosteroids from 4 weeks before surgery, coeliac or Crohn's disease, or another major cause of intestinal malabsorption and malnourishment, were excluded. Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study.

IR was estimated by calculating the validated index for homeostasis model assessment of IR (HOMA-IR) (Wallace et al. 2004). MO subjects were distributed into two groups according to the HOMA-IR score: noninsulin-resistant (NIR) (HOMA-IR < 3.8 ; $n = 14$) and insulin-resistant (IR) (HOMA-IR ≥ 3.8 ; $n = 27$). The cut-off point was previously defined for a Spanish population corresponding to the 90th percentile HOMA-IR value in non-diabetic adult subjects (Ascaso et al. 2001).

Blood samples were obtained by venipuncture from overnight fasting patients and collected in tubes free of anti-coagulant for serum isolation or with EDTA as an anti-coagulant for plasma extraction. Plasma and serum were obtained by centrifugation and then stored at -80°C until determinations were made.

Animal model for IR

To support the results obtained in human beings and to confirm that they are determined by the presence of IR but not any other potential mechanisms existing in individuals with morbidobesity, we evaluated

comparable determinations in a model of IR in absence of obesity: the fructose-fed rat.

A total of twenty male Sprague–Dawley rats from Harlan Laboratories (Barcelona, Spain) were used. Rats were kept in a room under 12:12 h light/dark cycles and with free access to chow and water. Fructose-fed rats were used as a well-characterized model of IRRs that has been validated previously (El Assar et al. 2015b; El Assar et al. 2015c). Four- to 5-week-old rats were fed with fructose (20% w/v) in drinking water for 8 weeks. At that time, the rats developed endothelial dysfunction, as manifested by an impaired ACh-induced relaxation, as well as IR as confirmed by the significant increase in the HOMA index compared to age-matched rats (El Assar et al. 2015b; El Assar et al. 2015c). Age-matched rats maintained under the same conditions but not receiving fructose in drinking water were used as control rats (CR).

Overnight-fasted rats were weighed and anaesthetized with diazepam (5 mg kg⁻¹) and ketamine (90 mg kg⁻¹). Blood samples were obtained via cardiac puncture and collected in anti-coagulant-free tubes and in EDTA-tubes for sera or plasma extraction for biochemical measurements. Sera and plasma were obtained by centrifugation and stored at -80°C until determinations were made. Immediately after blood collection, the mesenteric fat pad was removed in block for isolation of mesenteric microvessels and the thoracic aorta was carefully excised.

Biochemical measurements

Blood samples were collected from MO subjects for measurement of serum fasting glucose, glycosylated haemoglobin (HbA1C), serum fasting insulin, serum lipid profile and C-reactive protein (CRP) in accordance with the routine procedures of the Laboratory of Clinical Analyses of our hospital. HOMA-IR was calculated as described by Matthews et al. (1985). Circulating levels of insulin were determined in the serum of overnight fasting rats by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Merckodia AB, Uppsala, Sweden) in accordance with the manufacturer's instructions. Serum glucose concentrations were determined using a colorimetric commercial kit (Biolabo SA, Maizy, France). HOMA-IR, calculated as described above, was normalized to the value obtained in CR. All samples were assessed in duplicate.

Evaluation of vascular relaxation in isolated human microarteries

Small arteries (200–500 µm, 2 mm in length) were isolated from visceral fat obtained from MO subjects during laparoscopic surgery and placed in a Petri dish containing Krebs–Henseleit solution (KHS; composition in mM: 115 NaCl, 2.5 CaCl₂, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 25 NaHCO₃, 11.1 glucose and 0.03 Na₂EDTA). The arteries were cleaned, and

mounted as ring preparations on small vessel wire myographs containing KHS at 37°C continuously aerated with 95% O₂–5% CO₂ mixture, which gave a pH of 7.4, as described previously (Rodríguez-Manas et al. 2009; El Assar et al. 2013). Briefly, resting tension was calculated to obtain an internal circumference equivalent to 90% of the tension of the vessels when relaxed in situ under a transmural pressure of 100 mmHg, using Myo-Norm-4 (Cibertec, Madrid, Spain). Tension was continuously recorded via a data acquisition system (MP100A BIOPAC System; Biopac, Santa Barbara, CA, USA). To test for viability, arteries were allowed to stabilize for 30 min and then exposed to 125 mM K⁺ (KKHS; equimolar substitution of KCl for NaCl in KHS). The segments failing to produce a tension equivalent to a pressure of 100 mmHg were rejected. After a washout period, the arteries were contracted again with 25 mM K⁺, which produced 80% of the maximum response. When the contraction reached a plateau, endothelium-dependent relaxation was assessed by adding increasing concentrations of bradykinin (BK) (10 nM to 3 μM) to the organ bath. Responses to sodium nitroprusside (SNP; 1 nM to 100 μM) were used to test non-endothelium-dependent relaxation.

Determination of endothelium-dependent vasodilator responses in macro- and microvessels of rats

Small mesenteric arteries (200–500 μm, 2 mm in length) and thoracic aorta rings (4–5 mm in length) were set

up in wire myographs and organ baths, respectively, containing KHS at 37°C bubbled with 95% O₂–5% CO₂ mixture, in accordance with methods described previously (Rodríguez-Manas et al. 2003; Angulo et al. 1996). Tension was continuously recorded via a data acquisition system (MP100A BIOPAC System). For studying the vasodilator response of the mesenteric arteries and aorta, rings were first precontracted with norepinephrine (1–3 μM and 10–30 nM for mesenteric arteries and aorta, respectively). When a stable plateau was reached, increasing concentrations of ACh (final bath concentrations: 1 nM to 10 μM for mesenteric arteries; 10 nM to 10 μM for aorta) were added to the organ chamber and vasodilatory responses were determined. Responses to SNP (1 nM to 100 μM) were used to test non-endothelium-dependent relaxation.

Evaluation of the effect of L-arginine and arginase inhibition on vascular responses

To test the possible involvement of a diminished concentration/availability of NOS substrate with respect to the endothelial dysfunction related to IR in both experimental approaches, arterial segments were pretreated 30 min before BK or ACh administration with L-arginine (300 μM). In another series of experiments, the contribution of arginase to the defective relaxation associated with IR was determined by incubating vascular segments with the arginase inhibitor, N^ω-hydroxyl-nor-L-arginine (nor-NOHA) (10 μM) for 30 min.

The experiments were systematically performed in parallel for each series of experiments and the treatments with L-arginine or arginase inhibitor were randomly assigned to different segments from the same donor.

Determination of arginine, ADMA and DDAH1 content

Arginine was determined in plasma, whereas ADMA levels were measured in sera and visceral adipose tissue extract derived from human MO subjects. Levels of ADMA and arginine were determined in serum or plasma respectively, as well as in aortic homogenates of rats. The DDAH1 concentration was evaluated in the aortic tissue of animals. The measured concentrations of ADMA, arginine and DDAH1 evaluated in tissues (visceral adipose tissue or aortic rings) were normalized to the protein content (mg) of each visceral adipose tissue or aortic ring. All determinations, both in sera and tissue samples, were performed using the respective colorimetric ELISA kits (USCN Life Science Inc., Houston, TX, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. For each determination, samples were assessed in duplicate.

Determination of aortic arginase activity

Arginase activity in the aortic tissue lysate was measured by colorimetric determinations of an intermediate product formed from the arginase reaction with arginine in accordance with the manufacturer's

instructions of a commercially available kit (# ab180877; Abcam, Cambridge, UK). All tissue samples were assessed in duplicate and measured at 570 nm in kinetic mode for 30 min at 37°C using a GENios Plus instrument (TECAN, Mannedorf, Switzerland). The measured activities were normalized to protein content (mg) of each aortic ring.

Real-time PCR

Total RNA was isolated from human visceral arteries with RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The concentration and purity of RNA recovery were determined by spectrophotometry (ND-100 spectrophotometer; Nanodrop Technology, Montchanin, DE, USA). First-strand cDNA was synthesized from 250 ng of RNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) in accordance with the manufacturer's instructions. In total, 25 ng of cDNA was amplified by using TaqMan Gene Expression Master Mix and TaqMan

Gene Expression Assays (Life Technologies, Paisley, UK) with inventoried probes for eNOS (Hs00167166 m1), DDAH1 (Hs00201707 m1), DDAH2 (Hs00203889 m1), arginase-2 (Hs00982833 m1) and human GAPDH (4326317). PCR reactions (12 µl) were performed in duplicate on the 7500 Fast Real Time PCR System (Life Technologies) in accordance with the manufacturer's instructions. Transcript levels were normalized to GAPDH (used as a reference gene). Relative

expression levels were determined using the comparative Ct method [2–ddCt].

Chemicals

All drugs used were purchased from Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA), except for nor-NOHA, which was obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Drug solutions were made in distilled water, except norepinephrine, which was prepared in saline (0.9% NaCl) containing ascorbic acid (0.01% w/v) to avoid oxidation.

Statistical analysis

Categorical variables were analysed by the chi-squared test. Results from numerical variables are expressed as the mean \pm SE. The number of subjects/animals (N) or the number of vascular segments (n) used for relaxation curves is indicated as appropriate. Complete concentration–response curves to BK or to ACh in vessels from the participants and animals, respectively, were compared by two-way ANOVA. pD₂ (which is defined as the negative logarithm of the concentration of vasodilator required to obtain 50% of maximal relaxation) and the numerical variables for each subject/animal were compared using an unpaired Student's t test. Models of linear regression were constructed, with the pD₂ considered as the dependent variable. In all cases, $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analysed using SPSS, version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

Humans

Impaired endothelial vasodilatation related to IR in human morbid obesity: improvement by L-arginine. Insulin-resistant morbidly obese (IR-MO) subjects showed higher concentrations of fasting glucose, insulin and CRP, as well as notably elevated HOMA-IR, where as total cholesterol, high and low-density lipoprotein cholesterol levels were lower compared to the non-insulin-resistant morbidly obese (NIR-MO) group (Table 1). Comorbid conditions and the treatments received by the patients at the time of surgery are also shown in Table 1. As expected, the proportion of diabetes mellitus was significantly higher in IR-MO subjects.

Small mesenteric arteries derived from IR-MO subjects showed a clear reduction in the endothelium-mediated vasodilatation induced by BK compared to the NIR-MO group (Fig. 1A). To avoid a possible potential bias as a result of a comparison of the vascular segment-derived responses instead of comparing the response in subjects, we assessed the differences between the pD₂ values for BK averaged from all vascular segments from each subject by group (NIR-MO and IR-MO). This approach yielded results very similar to those observed when we analysed the response of the vessels (pD₂ values: 7.40 ± 0.14 vs. 6.45 ± 0.19 for NIR-MO and IR-MO subjects, respectively; $P = 0.001$). Furthermore, the vasorelaxant response to

BK in microarteries derived from MO subjects decreased as the HOMA-IR index increased, with a clear correlation between the HOMA-IR index and the BK pD2 values ($r = 0.397$; $P = 0.01$). Furthermore, among all factors studied, only HOMA-IR was associated with BK pD2 values.

Comparable differences in endothelial vasodilatation between NIR-MO and IR-MO groups were observed after excluding males from both groups (pD2 for BK after excluding male subjects: 7.42 ± 0.15 vs. 6.60 ± 0.26 , $P = 0.014$), and after excluding diabetic patients from IR-MO group (pD2 values were 7.40 ± 0.14 vs. 6.50 ± 0.24 for NIR-MO and IR-MO subjects, respectively; $P = 0.002$). No statistically significant differences were found in the non-endothelium-dependent vasodilations induced by SNP in microarteries from IR-MO subjects compared to NIR-MO subjects (pD2 4.95 ± 0.25 vs. 5.10 ± 0.30 for NIR-MO and IR-MO subjects, respectively; not significant).

A diminished concentration/availability of nitric oxide precursor, L-arginine, was tested as a possible mechanism underlying the altered vascular relaxation associated with the presence of IR status. Although plasma concentrations of arginine did not differ between insulin-resistant and insulin-sensitive MO subjects (Fig. 1B), incubating vascular segments with L-arginine ($300 \mu\text{M}$) resulted in a marked improvement in endothelial vasodilatation in IR-MO subjects (Fig. 1D), whereas it had no effect on microarteries derived from the NIR-MO group (Fig. 1C).

The presence of IR is associated with increased concentrations of systemic and tissue ADMA in morbidly obese subjects. Serum (Fig. 2A) and visceral adipose tissue extract (Fig. 2B) levels of ADMA derived from MO subjects were significantly increased in those who were insulin-resistant compared to NIR-MO subjects ($P < 0.05$). Furthermore, mRNA expression of both isoforms of the key enzyme of ADMA catabolism (DDAH-1 and DDAH-2) was significantly diminished in human microvessels in the IR condition, whereas no significant differences were detected in eNOS expression between IR-MO and NIR-MO subjects (Fig. 2C)

In addition, serum ADMA concentrations were positively correlated with HOMA-IR score and inversely correlated with endothelial vasodilatation capacity measured as BK pD2 values (Fig. 2D and E)

Arginase contributes to endothelial dysfunction associated with IR in human morbid obesity.

Arginase, a L-arginine catabolizing enzyme, has been postulated as a possible mechanism contributing to endothelial dysfunction. Accordingly, the mRNA expression of arginase-2 was determined in mesenteric microvessels derived from obese subjects. An up-regulation of arginase-2 gene expression was

detected in mesenteric microvessels from IR-MO subjects compared to the NIR-MO group

Arginase can decrease NO production by competing with NOS for arginine as a substrate. To determine the contribution of arginase to defective relaxation associated with IR, vascular segments were incubated with the arginase inhibitor, nor-NOHA (10 μ M). Arginase inhibition caused a significant improvement of endothelium-dependent vasodilatation in microarteries derived from IR-MO subjects (Fig. 3B). By contrast, nor-NOHA did not modify endothelial vasodilatation to BK in mesenteric microvessels from NIR-MO subjects (Fig. 3C).

Fructose-fed rats

Endothelial malfunction in a non-obese rat model of IR, which is alleviated by supplemental L-arginine. The administration of D-fructose (20%) to rats for 8 weeks resulted in significant hyperglycaemia compared to control-matched rats ($P < 0.001$), as indicated in Table 2. In line with observations in IR-MO subjects, a marked hyperinsulinaemia was also detected in IRRs because serum insulin levels were significantly elevated above the CRs ($P < 0.001$) (Table 2). The development of IR was confirmed by the significant increase in the HOMA-IR score ($P < 0.001$) (Table 2) compared to CRs. The main difference between human and animal models was the lack of significant obesity in IRRs because these rats were only slightly and non-significantly overweight compared to CRs (Table 2).

Similar to that observed in humans, endothelium-dependent vasodilatations induced by ACh (1 nM to 30 μ M) in rat mesenteric arteries and aortae were significantly impaired in arteries from IRRs compared to CRs, comprising a model of endothelial dysfunction determined by IR condition rather than by obesity (Fig. 4A and B). Meanwhile, no differences were observed in SNP-induced vasodilatations in both mesenteric arteries and aorta derived from IRRs compared to CRs (pD_2

7.02 ± 0.20 vs. 6.73 ± 0.17 for mesenteric arteries; pD_2 8.17 ± 0.07 vs. 8.20 ± 0.13 for aorta from CRs and IRRs respectively; not significant).

Similar to observations in the human microvasculature, in this animal model displaying IR but not obesity, acute treatment with L-arginine (300 μ M) enhanced the vasodilatation induced by ACh in mesenteric arteries (Fig. 4C) and aortae (Fig. 4D) derived from IRRs, whereas it did not modify vasodilatation in vessels from CRs (pD_2 : 7.40 ± 0.14 vs. 7.16 ± 0.18 ; 7.32 ± 0.07 vs. 7.33 ± 0.07 for mesenteric arteries and aortae, respectively; not significant). Arginine concentrations were then evaluated for both plasmatic and aortic extracts in IRRs. Neither plasma concentrations of arginine (Fig. 4E), nor the aortic content (Fig. 4F) of this substrate was significantly different between CRs and IRRs. Increased systemic and vascular ADMA concentrations promote endothelial dysfunction associated with IR in rats. Systemic and vascular

ADMA levels were determined in IRRs and CRs to further confirm the interaction between diminished arginine bioactivity and increased ADMA. Serum levels (Fig. 5A) and the aortic tissue content (Fig. 5B) of ADMA are significantly increased in fructose-fed rats compared to control-matched animals. Furthermore, the content of DDAH1 was significantly decreased in the aortic extract of IRRs compared to CRs (Fig. 5C).

Increased arginase activity as a possible mechanism underpinning endothelial dysfunction associated with IR in rats. The activity of arginase was determined in the aortae extract tissue derived from CRs and from IRRs. As shown in Fig. 6A, arginase activity was significantly increased in the aortae of IRRs compared to CRs.

To provide evidence related to the negative impact of arginase on endothelium-dependent relaxation in fructose-fed rats, vascular segments were incubated with the arginase inhibitor, nor-NOHA (10 μ M). Arginase inhibition caused a significant improvement of endothelium-dependent vasodilatation in both mesenteric arteries and aortae derived from fructose-fed animals (Fig. 6B and C). By contrast, nor-NOHA had no effect on the vasodilatation induced by ACh in arteries derived from CRs (pD₂: 7.52 ± 0.14 vs. 7.51 ± 0.15 and 7.35 ± 0.07 vs. 7.37 ± 0.08 , for mesenteric arteries and aortae, respectively).

Discussion

The major finding of the present study is that both an elevation of the concentrations of ADMA and an up-regulation of arginase activity contribute to the endothelial dysfunction as a result of the presence of IR in individuals with morbid obesity. The key role for IR is additionally supported by the data obtained in non-obese IRRs.

Obesity, an important cardiovascular risk factor, has been closely linked to IR among other metabolic derangements. This metabolic alteration, in turn, plays a pivotal role in the development of endothelial dysfunction (Prieto et al. 2014). In the present study, we confirm that MO subjects with IR demonstrated a significant decrease in endothelium-dependent vasodilatation with respect to MO subjects who were not insulin-resistant (El Assar et al. 2013; Lupattelli et al. 2013). In addition, and even though diabetes mellitus was only present in IR-MO subjects, this cardiovascular risk factor does not appear to explain the negative impact of IR on endothelial function because similar defects in endothelium-dependent vasodilatation were found after the exclusion of diabetic patients from IR-MO compared to NIR-MO. Similarly, the fact that the impairment of endothelial vasodilatation in IR-MO remains after deleting data from male patients in both groups reinforces the idea that endothelial dysfunction manifested in microarteries from human obese subjects is closely related to IR condition, discarding a confusing effect

of sex in the results. On the other hand, a larger percentage of IR-MO subjects were taking

hypoglycaemians and hypotensive drugs, with the vast majority being metformin, pioglitazone and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. This probably did not influence the impaired endothelial dysfunction in the IR-MO group because these agents have been reported to even improve endothelial vasodilatation (Miyamoto et al. 2012; Naka et al. 2012). Furthermore, we validated the observation obtained in humans in a well-characterized model of IR in non-obese fed-fructose rats. The IR rats showed elevated fasting blood glucose and serum insulin levels, as well as a higher HOMA score. All of these alterations indicated that IR accompanied the significant decrease in endothelium-dependent vasodilatation in these animals. The phenotype of the IRRs in the present study was consistent with that of previous studies reporting reduced endothelium-dependent vasodilatation in fructose-fed rats and other rat models of IR (Shinozaki et al. 1999; Young et al. 2008; El Assar et al. 2015b). Several possible pathophysiological mechanisms may underpin the association between IR and endothelial dysfunction. Indeed, we have reported the involvement of mitochondrial superoxide and inflammation in the impairment of NO-mediated vasodilatation determined by the presence of IR in human morbid obesity (El Assar et al. 2013). However, other mechanisms could contribute to the defective vascular availability of NO in IR. In this sense, ADMA causes a reduction in NO synthesis by inhibiting NOS (Pope et al. 2009). Although previous studies have reported higher plasma levels of ADMA in obese

patients with IR compared to NIR obese subjects (McLaughlin et al. 2006) and lower circulating concentrations of ADMA after pharmacological improvement of insulin sensitivity in IR patients (Asagami et al. 2002; Stuhlinger et al. 2002), conflicting results on the association between ADMA, NO production and HOMA-IR have been reported subsequently (Pamuk et al. 2010; Siervo & Bluck, 2012; Tanrikulu-Kucuk et al. 2015). These non-conclusive results highlight the need to clarify the role of ADMA on endothelial dysfunction related to IR. In this sense, we provide evidence that the ADMA concentration is increased when IR arises not only at a systemic level (in the serum) in humans and rats, but also locally, both in homogenized adipose tissue surrounding human microarteries from IR-MO subjects and in aortic tissue extracts from IRRs. Indeed, linear regression analysis showed a negative correlation between ADMA concentration and human endothelial function, measured as pD2 values, and a positive association with the IR parameter, HOMA-IR. These results indicate that increased endogenous ADMA is clearly associated with endothelial dysfunction in the presence of IR. In some way related to this concept, intensive insulin therapy was shown to reduce the plasma concentrations of ADMA in critically ill patients (Siroen et al. 2005), and such an effect might explain the ability of insulin therapy to preserve endothelial function in these patients (Langouche et al. 2005).

Because DDAH activity is the key modulator of endogenous ADMA content, the expression of DDAH

was determined. mRNA expression of both DDAH isoforms (1 and 2) in microarteries derived from obese subjects with IR was decreased compared to those with preserved insulin sensitivity. Furthermore, the expression of the dominant isoform of DDAH in metabolizing vascular ADMA, DDAH1 (Sydow et al. 2008; Hu et al. 2009), was significantly diminished in aortic extracts from rats displaying IR. These results are in agreement with previous studies showing decreased aortic DDAH1 content and DDAH activity in aortic tissues from rats with high-fat-induced IR (Chen et al. 2012). Considered globally, these findings suggest that the possible accumulation of endogenous ADMA might be a result of a reduction in the expression/activity of DDAH enzyme in IR. Indeed, preservation of DDAH has been proposed to contribute to the modulation of ADMA levels by insulin in addition to reduced protein breakdown and increased uptake of ADMA via transport systems (Siroen et al. 2006). We further reasoned that, besides the involvement of ADMA in the modulation of the L-arginine/NO pathway, the increased expression and/or activity of arginase plays a key role in compromising L-arginine availability to eNOS and therefore would impact vascular function. The validity of this assumption was confirmed in the present study. First, a significant rise in arginase activity was observed in aortic tissue derived from IR rats compared to CRs. Additionally, we describe for the first time increased arginase-2 gene expression in the microarteries of IR-MO subjects with no parallel alteration in eNOS vascular expression, indicating that

IR can differentially affect the expression of L-arginine metabolizing enzymes. Previous studies have demonstrated the presence of an augmented expression and activity of arginase-2 in the aorta of obese mice (Yu et al. 2014). In addition, increased activity of arginase has been detected in these rum and in the buffer of isolated aorta from rats fed with high levels of fructose for 12 weeks (El-Bassossy et al. 2013). Furthermore, elevated plasma arginase activity was found in type 2 diabetic patients (Kashyap et al. 2008). Arginase up-regulation in both IR humans and rats was accompanied by no significant changes in plasmatic arginine concentrations. Indeed, even a non-significant reduction of arginine concentration was found in aortic tissue from IR rats, indicating a probable role for diminished L-arginine bioavailability. This finding is of clinical importance because a clear association was found between reduced L-arginine availability and increases in cardiovascular disease and mortality (Tang et al. 2009).

Potentially, elevated arginase activity would negatively impact vascular function under IR conditions. In this sense, genetic ablation of arginase-2 fully preserved endothelial function (Yu et al. 2014) and prevented endothelial senescence (Yepuri et al. 2012). Consistent with this idea, we provide functional evidence suggesting that increased arginase activity and diminished L-arginine availability impacts negatively endothelial function. Acute arginase inhibition with nor-NOHA ameliorated endothelial malfunction associated with the IR state in human obesity and in fructose-fed rats. Our findings confirm

and expand previous studies showing that chronic arginase inhibition alleviates impaired endothelial-dependent relaxation associated with IR in the rat aorta (El-Bassosy et al. 2013) and recovers NO production in the aorta from obese mice (Chung et al. 2014). In addition, supplementation with L-arginine improved endothelial function in large and small arteries from IRR, as well as in microarteries from obese subjects with IR. Such evidence suggests that the putative reduction in L-arginine availability when generating endothelial NO results from both the increased concentration of a competitive antagonist (ADMA) and the hyperactivation of arginase under IR conditions.

A limitation of the present study is that ADMA content and arginase activity could not be determined in human vascular tissue because of the limited amount of microarteries dissected from each omentum specimen and the insufficient amount of protein obtained from these vascular samples that precluded any adequate guarantee of the methods of determination. We tried to overcome this limitation by making these determinations in vascular tissue from IRRs and by determining ADMA in adipose tissue surrounding mesenteric vessels and analysing arginase and DDAH-1/2 expression at mRNA levels in mesenteric microvessels. In conclusion, the present study identifies increased ADMA and up-regulated arginase as determinant factors in the alteration of the L-arginine/NO pathway, as well as the subsequent endothelial dysfunction associated with IR in human obesity and a well characterized non-obese animal

model of IR. We found that systemic and/or vascular levels of ADMA and arginase are increased by IR and that this enhancement is accompanied by impaired endothelial function (Fig. 7). Importantly, acute treatment of arteries derived from IR obese subjects or non-obese IR animals with arginase inhibitor or with L-arginine significantly improves endothelium-dependent vasodilatation, most probably by increasing L-arginine availability. These results provide novel insights regarding the mechanisms of endothelial dysfunction related to obesity and IR and establish potential therapeutic targets for intervention.

Table 1. Basal variables of morbidly obese subjects

| Characteristic | NIR (N = 14) | IR (N = 27) | P |
|---|-------------------|-------------------|--------|
| Clinical | | | |
| Age (years) | 45.6 ± 3.8 | 41.7 ± 1.9 | 0.376 |
| Sex (male/female) | 1 /13 | 13/14 | 0.014 |
| Body mass index (kg m ⁻²) | 45.0 ± 0.9 | 47.0 ± 1.1 | 0.215 |
| Diabetes mellitus type 2 (%) | 0.0 | 48.1 | <0.01 |
| Hypertension (%) | 21.4 | 51.9 | 0.061 |
| Dyslipidaemia (%) | 14.3 | 25.9 | 0.393 |
| Active smokers (%) | 7.1 | 22.2 | 0.224 |
| Chemical | | | |
| Fasting glucose (mg dl ⁻¹) | 88.4 ± 2.0 | 103.9 ± 2.7 | <0.01 |
| HbA _{1c} % (mmol mol ⁻¹) | 5.6 (35.18 ± 2.3) | 6.0 (40.44 ± 2.0) | 0.073 |
| Total cholesterol (mg dl ⁻¹) | 184.2 ± 9.6 | 153.9 ± 6.3 | 0.010 |
| HDL cholesterol (mg dl ⁻¹) | 47.7 ± 2.5 | 38.5 ± 1.8 | <0.01 |
| LDL cholesterol (mg dl ⁻¹) | 110.8 ± 8.2 | 87.2 ± 5.9 | 0.024 |
| Ratio (TC/HDL) | 3.9 ± 0.2 | 4.2 ± 0.3 | 0.644 |
| Triglycerides (mg dl ⁻¹) | 100.6 ± 8.4 | 127.3 ± 9.6 | 0.076 |
| Fasting insulin (μU ml ⁻¹) | 9.5 ± 0.3 | 32.9 ± 4.0 | <0.001 |
| HOMA-IR | 2.1 ± 0.1 | 8.6 ± 1.2 | <0.001 |
| CRP (mg l ⁻¹) | 5.0 ± 1.0 | 10.9 ± 1.4 | <0.01 |
| Treatment | | | |
| Hypoglycaemic drugs (%) | 0.0 | 48.1 | <0.01 |
| Hypotensive drugs (%) | 14.3 | 51.9 | 0.041 |
| Lipid-lowering drugs (%) | 0.0 | 18.5 | 0.097 |

HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; TC, total cholesterol. Significant differences are highlighted in bold.

Table 2. Body weight and serum concentrations of glucose and insulin for animals

| | CRs (N = 8) | IRRs (N = 12) |
|--|---------------|------------------|
| Body weight (g) | 408.4 ± 20.29 | 449.8 ± 13.83 |
| Fasting glucose (mg dl ⁻¹) | 123.5 ± 11.16 | 254.6 ± 22.60*** |
| Fasting insulin (μg l ⁻¹) | 1.47 ± 0.22 | 4.59 ± 0.61*** |
| HOMA-IR score | 1.00 ± 0.13 | 6.40 ± 0.94*** |

Data are expressed as the mean ± SE. N, number of rats used. ***P < 0.001 vs. control rats. Data were compared by a two-tailed unpaired Student's t test.

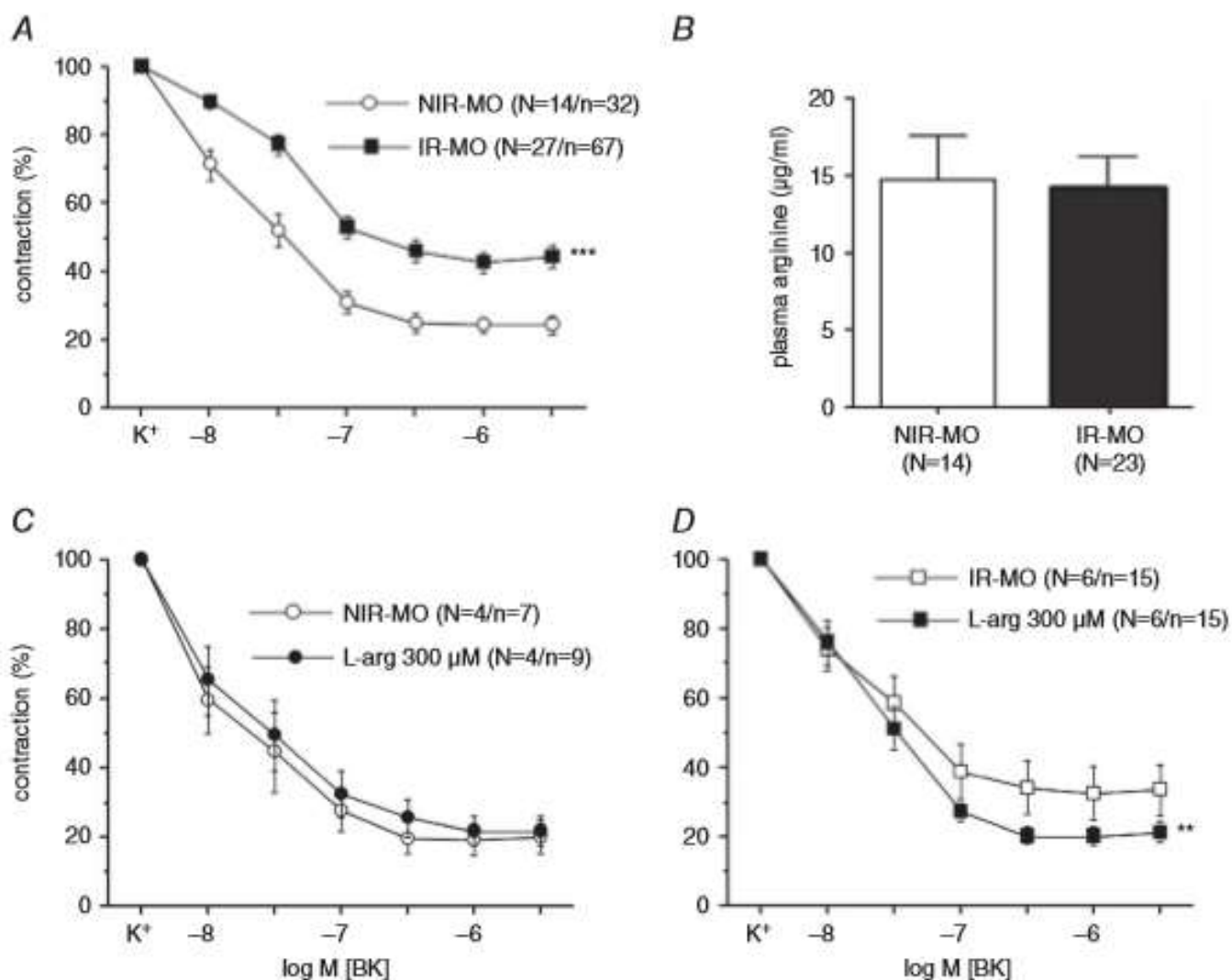


Figure 1. Effect of L-arginine on endothelial dysfunction associated with IR in morbidly obese subjects Relaxation to BK in mesenteric arterial segments derived from NIR-MO and IR-MO subjects (A) and effects of preincubation with L-arginine (L-arg) (300 μM) in arteries from NIR-MO (C) and IR-MO subjects (D). Data are expressed as the percentage of the contraction elicited by K⁺. ****P* < 0.001 vs. NIR-MO; ***P* < 0.01 vs. IR-MO subjects. B, plasmatic concentrations of arginine in NIR-MO and IR-MO subjects.

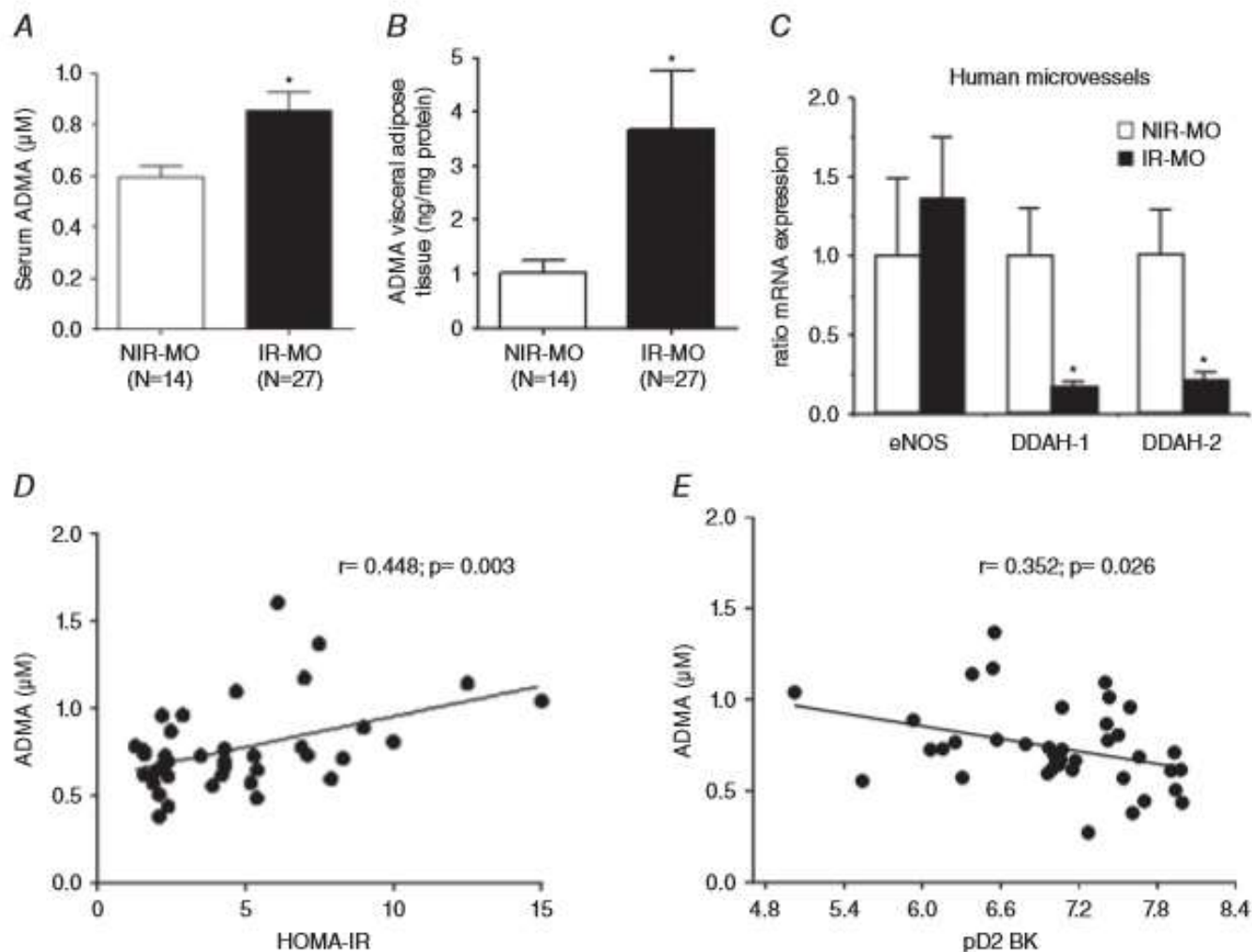


Figure 2. Insulin resistance is associated with increased levels of ADMA in morbidly obese subjects

ADMA values determined in sera (A) and in adipose tissue surrounding microarteries (B) from NIR-MO and IR-MO subjects. C, mRNA relative expression of eNOS, DDAH-1 and DDAH-2 in mesenteric arteries derived from NIR-MO and IR-MO. Mesenteric arteries for gene expression analysis were obtained from four to eight different patients. * $P < 0.05$ vs. NIR-MO subjects. D, positive correlation between ADMA concentrations and HOMA-IR score. E, negative correlation between ADMA and pD₂ values for BK. Each point represents the averaged pD₂ values of segments from one single subject.

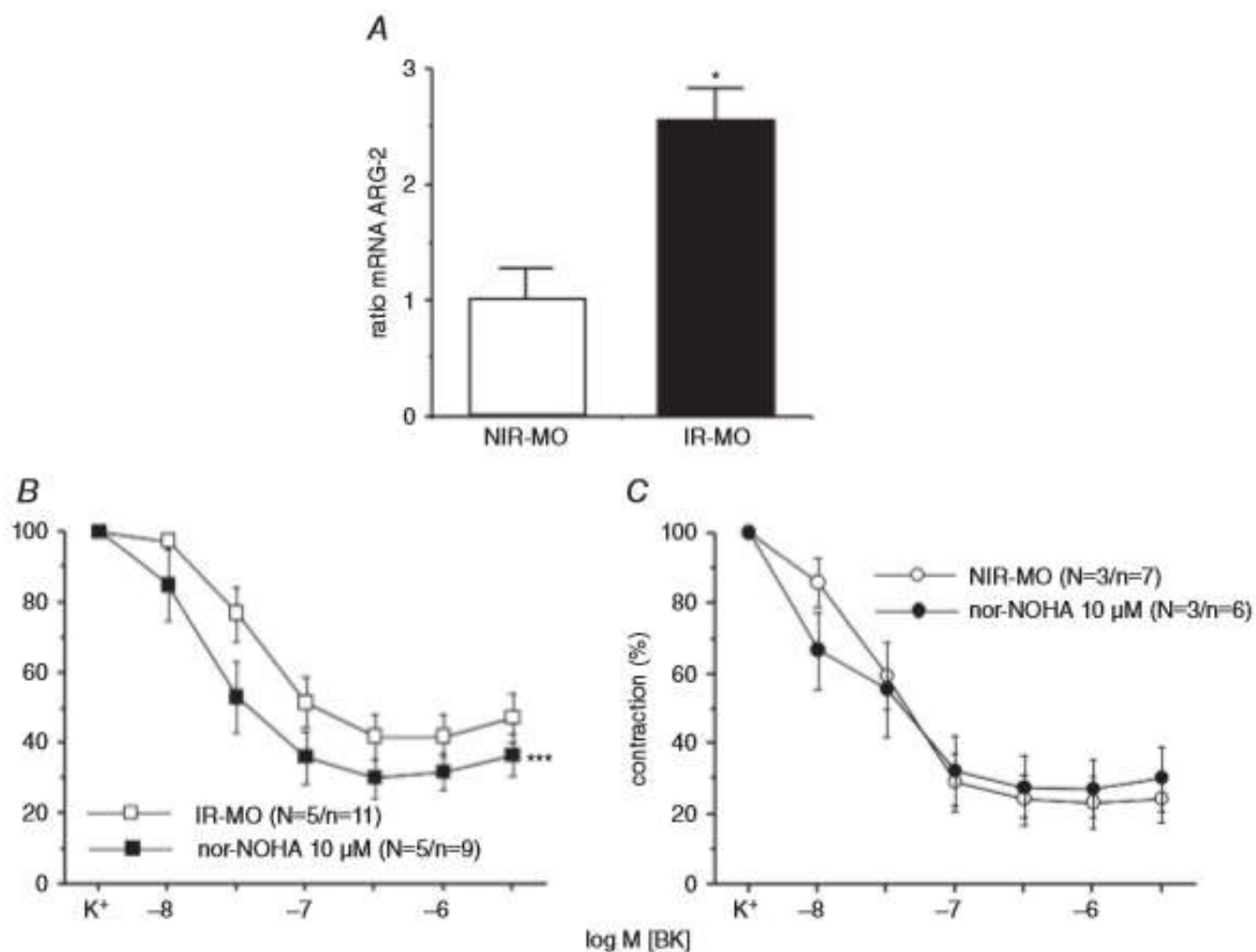


Figure 3. Arginase contributes to the endothelial dysfunction related to IR in morbidly obese patients
 A, arginase-2 (Arg-2) mRNA relative expression in isolated mesenteric arteries from NIR-MO and IR-MO subjects. * $P < 0.05$ vs. NIR-MO subjects. Mesenteric arteries were obtained from four to five different patients. The effect of preincubation with arginase inhibitor, nor-NOHA (10 μ M), on relaxation to BK in mesenteric arterial segments derived from NIR-MO (C) and IR-MO (B) subjects is shown. Data are expressed as the percentage of contraction elicited by K⁺. ** $P < 0.01$ vs. IR-MO subjects.

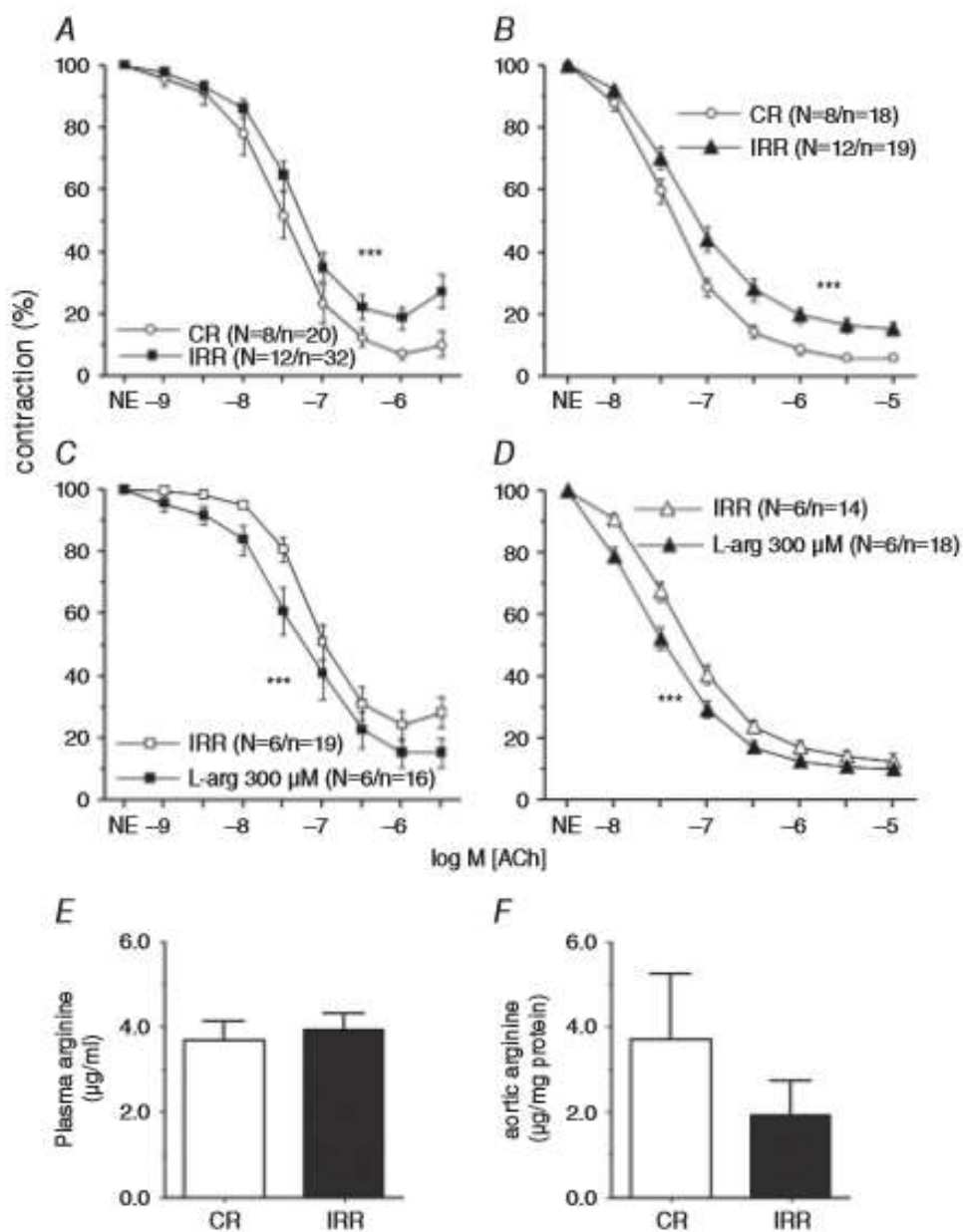


Figure 4. Endothelial dysfunction in non-obese fructose-fed rats and alleviation by L-arginine

Relaxant responses elicited by ACh in small mesenteric arteries (A) and aortae (B) from CRs and IRRs. Acute treatment with L-arginine (L-arg) (300 μM) improves relaxant responses to ACh in mesenteric arteries (C) and aortae (D) from IRRs. Data are expressed as the percentage of the contraction elicited by norepinephrine (NE). *** $P < 0.001$ vs. CRs or vs. IRRs (in the case of L-arginine experiments). Arginine content was also determined in plasma (E) and aortic homogenates (F) from CRs and IRRs. The samples for analysis were collected from seven to nine different animals.

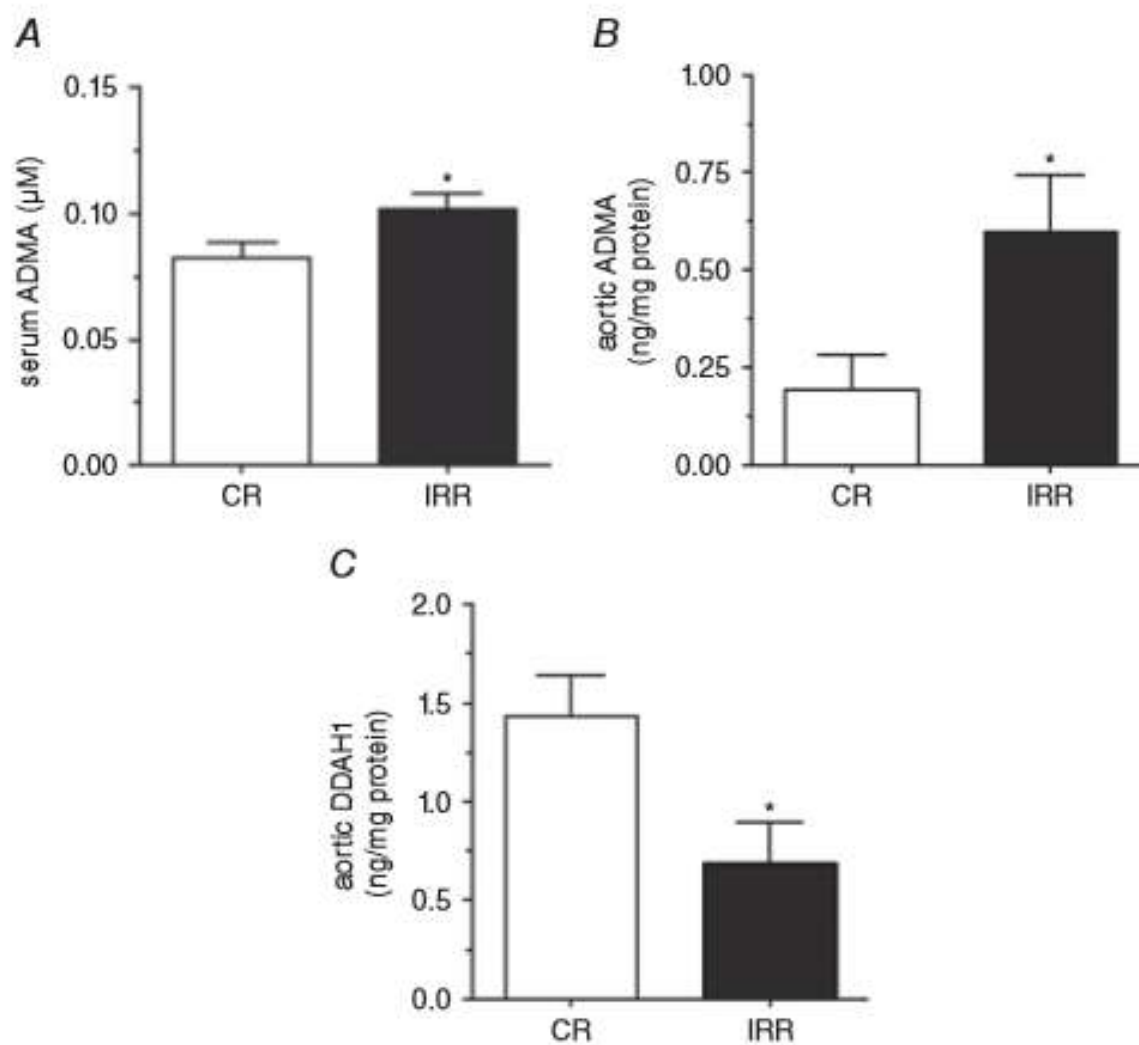


Figure 5. Systemic and aortic ADMA levels in fructose-fed rats

A, serum concentrations of ADMA in IRRs and their matched CRs. The aortic content of ADMA (B) and DDAH-1 (C) is also shown. Samples were collected from seven different animals. * $P < 0.05$ vs. CR.

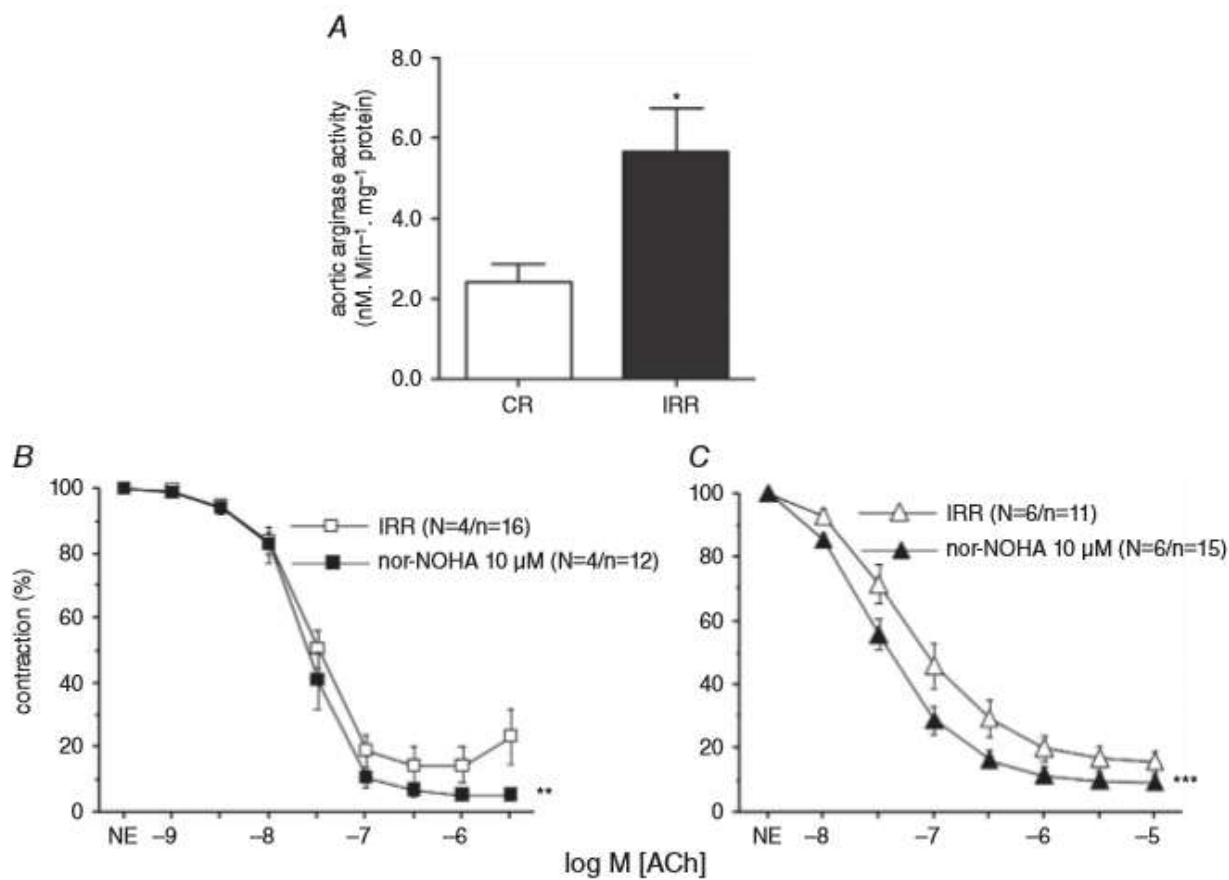


Figure 6. Arginase contributes to the endothelial dysfunction observed in non-obese fructose-fed rats
 Arginase activity in aortic extract of CRs and IRRs is shown in (A). The aortae were extracted from seven to 10 animals for each group. The effects of the arginase inhibitor, nor-NOHA (10 μ M), on relaxation to ACh in mesenteric arteries (B) and aorta (C) of IRRs is shown. Data are expressed as the percentage of the contraction elicited by norepinephrine (NE). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. IRR.

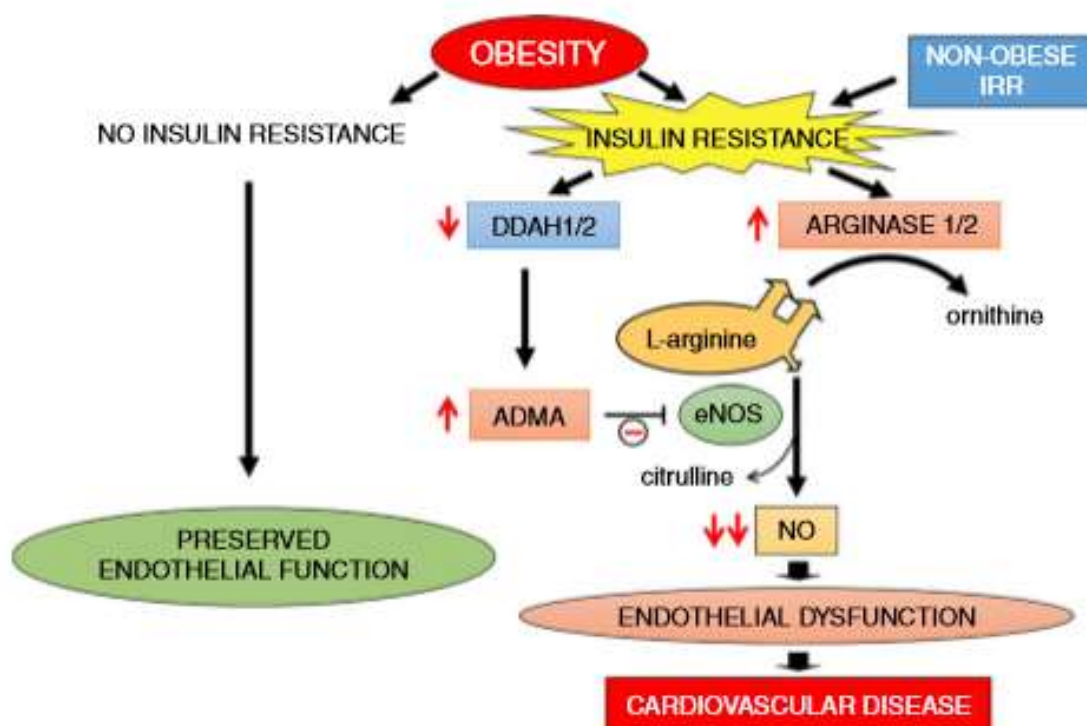


Figure 7. Schematic representation of mechanisms involved in L-arginine/NO pathway impairment caused by IR leading to endothelial dysfunction

Development of the IR condition, either associated with obesity or not, results in the diminished expression of DDAH, the enzyme responsible for ADMA degradation, causing a significant intracellular elevation of ADMA and therefore interfering with the L-arginine/NO signalling pathway. In addition, arginase is up-regulated leading to an altered L-arginine/NO pathway. These alterations result in defective NO-mediate responses and subsequent endothelial dysfunction, which represents a first step toward cardiovascular disease.

References

- Anderssohn M, Schwedhelm E, Luneburg N, Vasan RS & Boger RH (2010). Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* **7**, 105–118.
- Angulo J, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C, Marin J & Rodriguez-Manas L (1996). Impairment of endothelium-dependent relaxation by increasing percentages of glycosylated human hemoglobin. Possible mechanisms involved. *Hypertension* **28**, 583–592.
- Asagami T, Abbasi F, Stuelinger M, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Reaven GM & Tsao PS (2002). Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* **51**, 843–846.
- Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C & Carmena R (2001). [Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population]. *Med Clin (Barc)* **117**, 530–533.
- Boger RH (2004). Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the 'L-arginine paradox' and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* **134**, 2842S–2847S; discussion 2853S.
- Burke GL, Bertoni AG, Shea S, Tracy R, Watson KE, Blumenthal RS, Chung H & Carnethon MR (2008). The impact of obesity on cardiovascular disease risk factors and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Intern Med* **168**, 928–935.
- Caplin B & Leiper J (2012). Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in the biology of disease: markers, mediators, and regulators? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1343–1353.
- Chen P, Xia K, Zhao Z, Deng X & Yang T (2012). Atorvastatin modulates the DDAH1/ADMA system in high-fat diet-induced insulin-resistant rats with endothelial dysfunction. *Vasc Med* **17**, 416–423.
- Chung JH, Moon J, Lee YS, Chung HK, Lee SM & Shin MJ (2014). Arginase inhibition restores endothelial function in diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **451**, 179–183.
- Das UN, Repositi G, Dain A & Eynard AR (2011). L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front Biosci (Landmark Ed)* **16**, 13–20.
- Durante W, Johnson FK & Johnson RA (2007). Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **34**, 906–911.
- El-Bassossy HM, El-Fawal R, Fahmy A & Watson ML (2013). Arginase inhibition alleviates hypertension in the metabolic syndrome. *Br J Pharmacol* **169**, 693–703.
- El Assar M, Angulo J & Rodríguez-Manas L (2015~ a). Diabetes and ageing induced vascular inflammation. *J Physiol* doi: 10.1113/JP270841. [Epub ahead of print]
- El Assar M, Angulo J, Santos-Ruiz M, Moreno P, Novials A, Villanueva-Penacarrillo ML & Rodriguez-Manas L (2015~ b). Differential effect of amylin on endothelial-dependent vasodilation in mesenteric arteries from control and insulin resistant rats. *PLoS ONE* **10**, e0120479.
- El Assar M, Ruiz de Adana JC, Angulo J, Pindado Martinez ML, Hernandez Matias A & Rodriguez-Manas L (2013).~ Preserved endothelial function in human obesity in the absence of insulin resistance. *J Transl Med* **11**, 263.
- El Assar M, Sanchez-Puelles JM, Royo I, Lopez-Hernandez E, Sanchez-Ferrer A, Acena JL, Rodriguez-Manas L & Angulo J (2015c). FM19G11 reverses endothelial dysfunction in rat and human arteries through stimulation of the PI3K/Akt/eNOS pathway, independently of mTOR/HIF-1alpha activation. *Br J Pharmacol* **172**, 1277–1291.
- Fujii N, Tsuchihashi K, Sasao H, Eguchi M, Miurakami H, Hase M, Higashiura K, Yuda S, Hashimoto A, Miura T, Ura N & Shimamoto K (2008). Insulin resistance functionally limits endothelium-dependent coronary vasodilation in nondiabetic patients. *Heart Vessels* **23**, 9–15.
- Hu X, Xu X, Zhu G, Atzler D, Kimoto M, Chen J, Schwedhelm E, Luneburg N, Boger RH, Zhang P & Chen Y (2009). Vascular endothelial-specific dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1-deficient mice reveal that vascular endothelium plays an important role in removing asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **120**, 2222–2229.
- Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM & DeFronzo RA (2008). Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **31**, 134–139.
- Katakam PV, Ujhelyi MR & Miller AW (1999). EDHF-mediated relaxation is impaired in fructose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**, 461–467.

- Kocak H, Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Oner P & Esin D (2011). Serum asymmetric dimethylarginine and nitric oxide levels in obese postmenopausal women. *J Clin Lab Anal* **25**, 174–178.
- Langouche L, Vanhorebeek I, Vlasselaers D, Vander Perre S, Wouters PJ, Skogstrand K, Hansen TK, Van den Berghe G (2005). Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients. *J Clin Invest* **115**, 2277–2286.
- Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS & Vallance P (1999). Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J* **343**, 209–214.
- Lupattelli G, De Vuono S, Boni M, Helou R, Raffaele Mannarino M, Rita Roscini A, Alaeddin A, Pirro M & Vaudo G (2013). Insulin resistance and not BMI is the major determinant of early vascular impairment in patients with morbid obesity. *J Atheroscler Thromb* **20**, 924–933.
- Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA & Wu G (2006). Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* **49**, 351–359.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412–419.
- McLaughlin T, Stuhlinger M, Lamendola C, Abbasi F, Bialek J, Reaven GM & Tsao PS (2006). Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations are elevated in obese insulin-resistant women and fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1896–1900.
- Ming XF, Rajapakse AG, Yepuri G, Xiong Y, Carvas JM, Ruffieux J, Scerri I, Wu Z, Popp K, Li J, Sartori C, Scherrer U, Kwak BR, Montani JP & Yang Z (2012). Arginase II promotes macrophage inflammatory responses through mitochondrial reactive oxygen species, contributing to insulin resistance and atherogenesis. *J Am Heart Assoc* **1**, e000992.
- Miyamoto M, Kotani K, Ishibashi S & Taniguchi N (2012). The effect of antihypertensive drugs on endothelial function as assessed by flow-mediated vasodilation in hypertensive patients. *Int J Vasc Med* **2012**, 453264.
- Naka KK, Papathanassiou K, Bechlioulis A, Pappas K, Kazakos N, Kanioglou C, Kostoula A, Vezyraki P, Makriyiannis D, Tsatsoulis A & Michalis LK (2012). Effects of pioglitazone and metformin on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes treated with sulfonylureas. *Diab Vasc Dis Res* **9**, 52–58.
- Pamuk BO, Torun AN, Kulaksizoglu M, Ertugrul D, Ciftci O, Kulaksizoglu S, Yildirim E & Demirag NG (2010). Asymmetric dimethylarginine levels and carotid intima-media thickness in obese patients with polycystic ovary syndrome and their relationship to metabolic parameters. *Fertil Steril* **93**, 1227–1233.
- Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Galiano Leone G, Bruni R, Di Cello S, Pascale A, Talarico G, Greco L, Andreozzi F & Sesti G (2010). Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int J Cardiol* **142**, 236–241.
- Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Maas R, Boger RH, Tripepi G, Sesti G & Zoccali C (2005). Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* **46**, 518–523.
- Pope AJ, Karupiah K & Cardounel AJ (2009). Role of the PRMT-DDAH-ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol Res* **60**, 461–465.
- Prieto D, Contreras C & Sanchez A (2014). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol* **12**, 412–426.
- Reaven G (2012). Insulin resistance and coronary heart disease in nondiabetic individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 1754–1759.
- Reaven GM (2011). Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* **95**, 875–892.
- Rodriguez-Manas L, Angulo J, Vallejo S, Peiro C, ~ Sanchez-Ferrer A, Cercas E, Lopez-Doriga P & Sanchez-Ferrer CF (2003). Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia* **46**, 556–566.
- Rodriguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, ~ Solis J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gomez-Guerrero C, Peiro C & Sanchez-Ferrer CF (2009). Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Ageing Cell* **8**, 226–238.
- Rudofsky G, Roeder E, Merle T, Hildebrand M, Nawroth PP & Wolfrum C (2011). Weight loss improves endothelial function independently of ADMA reduction in severe obesity. *Horm Metab Res* **43**, 343–348.
- Sciacqua A, Grillo N, Quero M, Sesti G & Perticone F (2012). Asymmetric dimethylarginine plasma levels and endothelial function in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Int J Mol Sci* **13**, 13804–13815.

- Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N & Kikkawa R (1999). Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/ O_2^- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* **48**, 2437–2445.
- Siervo M & Bluck LJ (2012). In vivo nitric oxide synthesis, insulin sensitivity, and asymmetric dimethylarginine in obese subjects without and with metabolic syndrome. *Metabolism* **61**, 680–688.
- Siroen MP, Teerlink T, Nijveldt RJ, Prins HA, Richir MC & van Leeuwen PA (2006). The clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Annu Rev Nutr* **26**, 203–228.
- Siroen MP, van Leeuwen PA, Nijveldt RJ, Teerlink T, Wouters PJ & Van den Berghe G (2005). Modulation of asymmetric dimethylarginine in critically ill patients receiving intensive insulin treatment: a possible explanation of reduced morbidity and mortality? *Crit Care Med* **33**, 504–510.
- Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM & Tsao PS (2002). Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* **287**, 1420–1426.
- Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y & Harano Y (2007). Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone. *Diabetes Res Clin Pract* **76**, 12–17.
- Sydow K, Mondon CE, Schrader J, Konishi H & Cooke JP (2008). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase overexpression enhances insulin sensitivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 692–697.
- Tang WH, Wang Z, Cho L, Brennan DM & Hazen SL (2009). Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* **53**, 2061–2067.
- Tanrikulu-Kucuk S, Kocak H, Oner-Iyidogan Y, Seyithanoglu M, Topparmak E & Kayan-Tapan T (2015). Serum fetuin-A and arginase-1 in human obesity model: is there any interaction between inflammatory status and arginine metabolism? *Scand J Clin Lab Invest* **75**, 301–307.
- Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J & Moncada S (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* **339**, 572–575.
- Wallace TM, Levy JC & Matthews DR (2004). Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* **27**, 1487–1495.
- Yang Z & Ming XF (2013). Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation. *Front Immunol* **4**, 149.
- Yepuri G, Velagapudi S, Xiong Y, Rajapakse AG, Montani JP, Ming XF & Yang Z (2012). Positive crosstalk between arginase-II and S6K1 in vascular endothelial inflammation and aging. *Aging Cell* **11**, 1005–1016.
- Young EJ, Hill MA, Wiehler WB, Triggle CR & Reid JJ (2008). Reduced EDHF responses and connexin activity in mesenteric arteries from the insulin-resistant obese Zucker rat. *Diabetologia* **51**, 872–881.
- Yu Y, Rajapakse AG, Montani JP, Yang Z & Ming XF (2014). p38 mitogen-activated protein kinase is involved in arginase-II-mediated eNOS-uncoupling in obesity. *Cardiovasc Diabetol* **13**, 113.

Additional information

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

MEA, JA and LRM designed, analysed, interpreted data, and drafted the manuscript. MSR and ASF performed experiments, and analysed data. JCRD, MLP and AHM provided specimens and interpreted data. All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding

The present work was funded by grants received from the Ministerio de Economía y Competitividad and cofunded by Fondos FEDER (Instituto de Salud Carlos III, PI11/01068, RETICEF RD12/0043), Spanish Government.