

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Fisiología



**PAPEL DE LA LEPTINA SOBRE LAS ALTERACIONES
CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD :
MECANISMOS IMPLICADOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Ernesto Martínez Martínez

Bajo la dirección de la doctora

Victoria Cachafeiro Ramos

Madrid, 2014



Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

**PAPEL DE LA LEPTINA SOBRE LAS ALTERACIONES
CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD:
MECANISMOS IMPLICADOS**

TESIS DOCTORAL

Ernesto Martínez Martínez

2013

Dra. **VICTORIA CACHOFEIRO RAMOS**, Catedrática de Fisiología, del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo: **“PAPEL DE LA LEPTINA SOBRE LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD: MECANISMOS IMPLICADOS”** ha sido realizado bajo su dirección, y se encuentra en condiciones para ser presentado como memoria para obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste y surta efectos donde corresponda expido el presente certificado.

Madrid, Septiembre del 2013.

Fdo: Dra. Victoria Cachofeiro Ramos.

Dra. **MARÍA MIANA ORTEGA**, Investigador Asociado a Proyecto del Departamento de Fisiología, de la Facultad de Medicina, de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo: **“PAPEL DE LA LEPTINA SOBRE LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD: MECANISMOS IMPLICADOS”** ha sido realizado bajo su dirección, y se encuentra en condiciones para ser presentado como memoria para obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste y surta efectos donde corresponda expido el presente certificado.

Madrid, Septiembre del 2013.

Fdo: Dra. María Miana Ortega.

Dra. **MARÍA LUACES MÉNDEZ**, Médico Adjunto del Servicio de Cardiología, del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

CERTIFICA:

Que el trabajo: **“PAPEL DE LA LEPTINA SOBRE LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA OBESIDAD: MECANISMOS IMPLICADOS”** ha sido realizado bajo su dirección, y se encuentra en condiciones para ser presentado como memoria para obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste y surta efectos donde corresponda expido el presente certificado.

Madrid, Septiembre del 2013.

Fdo: Dra. María Luaces Méndez.

ABREVIATURAS

Ach: Acetil colina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

BSA: Albumina de suero bovino.

Col I: Colágeno tipo I.

Col III: Colágeno tipo III.

COLESTEROL HDL: Colesterol Lipoproteínas de alta densidad.

COLESTEROL LDL: Colesterol Lipoproteínas de baja densidad.

CT: Control.

CTGF: Factor de crecimiento de tejido conectivo.

DHE: Dihidroetidio.

DM: Diabetes Mellitus.

DTDVI: Diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo.

DTSVI: Diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

FC: Frecuencia cardiaca.

FE: Fenilefrina.

FE: Fracción eyección.

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

FN: Fibronectina.

GLP-1: Péptido similar al glucagón tipo I.

GPR: Grosor parietal relativo.

HOMA: Evaluación con el modelo homeostático.

HTA: Hipertensión arterial.

IL: Interleuquina.

IMC: Índice de masa corporal.

LacNac: N-acetillicosamina.

LEP: Leptina.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

MEL: Melatonina.

MMPs: Metaloproteinasas.

MPO: Mieloperoxidasa.

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero.

NO: Óxido nítrico.

NPS: Nitroprusiato sódico.

NTproBNP: Fracción aminoterminal del péptido natriurético cerebral.

O₂⁻: Aniones superóxido.

OB: Obeso.

PAD: Presión arterial diastólica.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1.

PAS: Presión arterial sistólica.

PCR: Proteína C reactiva.

PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa.

PVDF: Polifluoruro de vinilideno.

RAP: Rapamicina.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

TG: Triglicéridos.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante- β .

TIMPs: InhibidorES de metaloproteasas de tejido.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α .

VI: Ventrículo izquierdo.

α -SMA: α -Actina de músculo liso.

Índice

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	
I. OBESIDAD.	23
I.1. Definición, clasificación y diagnóstico.	23
I.2. Datos epidemiológicos.	26
I.3. Factores etiológicos.	28
I.4. Bases moleculares de la obesidad.	31
I.5. Obesidad y enfermedad cardiovascular.	32
I.5.1. Obesidad y remodelado cardiaco.	34
I.5.2. Cambios estructurales en el corazón durante la obesidad.	34
I.5.3. Cambios funcionales en el corazón durante la obesidad.	37
I.5.4. Obesidad y remodelado vascular.	38
I.5.5. Obesidad y disfunción endotelial.	39
I.5.6. Mecanismos que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.	41
I.6. Modelos animales en obesidad.	43
II. TEJIDO ADIPOSO.	46
II.1. Distribución y organización del tejido adiposo.	46
II.2. El tejido adiposo como órgano endocrino	48
III. LEPTINA.	50
III.1. Receptor de leptina.	52
III.2. Vías de señalización de la leptina.	53

III.2.1. Vía JAK/STAT.	53
III.2.2. Vía fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K).	54
III.2.3. Vía MAP-quinasa (MAPK).	55
III.3. Efectos de la leptina.	56
III.3.1. Efectos de la leptina sobre la ingesta de alimentos.	56
III.3.2. Efectos cardiovasculares de la leptina.	58
a) Efectos cardiacos de la leptina.	59
b) Efectos vasculares de la leptina.	61
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
I. HIPÓTESIS.	65
II. OBJETIVOS.	66
I. HYPOTHESIS	68
II. OBJECTIVES.	69
MATERIAL Y MÉTODOS	
I. ESTUDIO EN PACIENTES.	72
I.1 Grupo de pacientes.	72
I.2 Mediciones antropométricas.	72
I.3 Ecocardiografía	73
I.4 Pruebas de laboratorio.	74
I.5 Parámetros circulantes.	75
II. ESTUDIO EX VIVO.	76
II.1 Modelo experimental.	76
II.1.1. Animales.	76

II.1.2. Estudio de la estructura y la función cardiaca.	77
II.1.3. Sacrificio de los animales.	78
II.2. Función vascular.	79
II.3. Procesamiento de las muestras de tejido para su análisis.	80
II.4. Determinaciones histológicas.	81
II.5. Estudios de composición de la aorta.	82
II.6. Detección <i>in situ</i> de la producción de O_2^- .	83
II.7. Western blot.	83
II.8. RT-PCR en tiempo real.	86
III. ESTUDIO <i>IN VITRO</i>.	88
III.1 Modelo experimental.	88
III.1.1. Animales.	88
III.1.2. Extracción de cardiofibroblastos.	89
III.1.3. Extracción de células de músculo liso.	90
III.1.4. Estudios del papel de la leptina en cardiofibroblastos.	91
III.1.5. Estudios del papel de la leptina en células de músculo liso.	92
III.2. Procesamiento de las muestras celulares para su análisis.	92
III.3. Western blot.	93
III.4. RT-PCR en tiempo real.	95
III.5. Estudios de la producción intracelular de aniones superóxido.	96
III.6. Estudios de actividad de metaloproteinasas (MMPs).	96
IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	98
IV.1. Análisis de datos del estudio clínico.	98

IV.2. Análisis de datos del modelo experimental.	98
V. ANEXO (REACTIVOS).	99
RESULTADOS	
I. MODIFICACIONES ANATOMOFUNCIONALES DEL CORAZÓN EN LA OBESIDAD MÓRBIDA.	104
I.1. Datos epidemiológicos. Efectos de la obesidad sobre parámetros metabólicos y presión arterial.	104
I.2. Efectos sobre la estructura y función cardíaca.	106
I.3. Geometría del ventrículo izquierdo.	107
I.4. Efectos sobre parámetros circulantes.	108
II. EFECTOS CARDIOVASCULARES DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATA ADULTA.	111
II.1. Efectos de la obesidad inducida por dieta sobre el peso corporal, parámetros metabólicos y la presión arterial.	111
II.2. Efectos cardíacos de la obesidad inducida por dieta.	113
II.2.1. Efectos sobre la función y estructura cardíaca.	113
II.2.2. Efectos sobre la fibrosis cardíaca.	116
II.2.3. Efectos sobre la producción cardíaca de aniones superóxido O_2^- .	120
II.2.4. Efectos sobre la vía PI3K/Akt/mTOR.	121
II.2.5. Efectos sobre los niveles cardíacos de leptina y adiponectina.	121
II.2.6. Asociaciones encontradas entre los niveles cardíacos de leptina y mediadores fibróticos en el corazón.	123
II.2.7. Efectos de la leptina sobre cardiofibroblastos de rata adulta.	125
a) Caracterización de la estirpe celular en cardiofibroblastos de rata adulta.	125

b) Efectos de la leptina sobre la matriz extracelular en cardiomioblastos.	126
c) Efectos de la leptina sobre la producción de aniones superóxido O_2^- en cardiomioblastos.	129
d) Influencia del estrés oxidativo sobre los efectos de la leptina en cardiomioblastos.	130
e) Influencia de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre los efectos de la leptina en cardiomioblastos.	133
f) Papel de la galectina-3 sobre los efectos de la leptina en cardiomioblastos.	139
II.3. Efectos de la obesidad inducida por dieta sobre la aorta en rata adulta.	142
II.3.1. Efectos sobre la función y la morfometría de la aorta.	142
II.3.2. Efectos sobre la fibrosis vascular.	143
II.3.3. Efectos sobre la producción vascular de aniones superóxido O_2^- .	150
II.3.4. Efectos sobre la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR a nivel vascular.	151
II.3.5. Efectos sobre los niveles vasculares de leptina y adiponectina.	152
II.3.6. Asociaciones encontradas entre los niveles vasculares de leptina y mediadores fibróticos en la aorta.	153
II.3.7. Efectos de la leptina sobre células de músculo liso de rata adulta.	156
a) Efectos de la leptina sobre la matriz extracelular en células de músculo liso.	156
b) Efectos de la leptina sobre la producción de aniones superóxido O_2^- en células de músculo liso.	161
c) Influencia del estrés oxidativo sobre los efectos de la leptina en células de músculo liso.	162
d) Influencia de la activación de la vía PI-3K/Akt/mTOR sobre los efectos de la leptina en células de músculo liso.	165

DISCUSIÓN

I. Efectos cardiacos de la obesidad mórbida.	172
II. Efectos cardiacos de la obesidad inducida por dieta en rata.	174
III. Efectos vasculares de la obesidad inducida por dieta en rata.	177
IV. Efectos directos de la leptina en cardiomiocitos procedentes de rata adulta.	179
V. Efectos directos de la leptina en células de músculo liso procedentes de rata adulta.	183
CONCLUSIONES	188
CONCLUSIONS	192
BIBLIOGRAFÍA	194

Summary

SUMMARY

INTRODUCTION.

Obesity has become a global problem of the first magnitude. Currently, 16.4% of the Spanish population is obese, and 1 in every 10 adults worldwide is obese ¹. Weight loss is one of the pillars upon which any strategy towards improving the cardiovascular profile is based. Excess adiposity and obesity are risk factors for death, and there is an established relationship between obesity and comorbidities such as hypertension, diabetes mellitus, and even cancer (Pischon et al., 2008). Heart disorders in obesity include structural adaptation with left ventricular hypertrophy, ventricular and atrial dilation; also present are functional abnormalities with diastolic dysfunction and, potentially, congestive heart failure ². At cardiac level, remodeling is one of the common alterations observed in obese patients, although the specific pattern (eccentric or concentric) is not well established (Mandry et al., 2012; Kronborg et al., 2012; Luaces et al., 2012). Cardiac remodeling involves phenotypic changes in the myocytes as well as in the extracellular matrix (ECM), which results in myocardial fibrosis (Litwin, 2010; Hayden et al., 2006; Panchal et al., 2011).

Cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes and obesity are associated with vascular alterations, mainly characterized by media thickening ³. Vascular remodeling produced a permanent change in the diameter of blood vessels -- in which fibrosis is an important feature -- besides VSMCs proliferation. Alterations in ECM composition and structure is a major determinant of vascular compliance and consequent arterial stiffening, a change known to be predictive of increased cardiovascular mortality (Laurent et al., 2005; Redon et al., 2009). Moreover, ECM not only provides structural support for cells and organs, it is also able to exchange information with cells; it thereby modulates a whole variety of processes, including cell migration, attachment, differentiation, and repair ⁴.

Besides hemodynamic factors, additional mechanisms must be underlying these alterations. These include local factors produced by ectopic fat accumulation in cardiovascular system that present some of the characteristics of the visceral adipose tissue, including the production of a variety of adipokines. Among all these adipokines, leptin has been the center of attention in the last years as a potential mediator of the cardiovascular alterations in obesity.

Leptin is a 16 KDa protein which was first identified as a byproduct of adipose tissue and is secreted into the bloodstream in proportion to adipose tissue size ⁵. Although leptin regulates food intake and energy homeostasis, obesity is associated with hyperleptinemia, which has been explained as a selective leptin resistance at central nervous system but not in peripheral tissues. These high leptin levels could affect its peripheral actions, including in the cardiovascular system where leptin is produced by different cells and there is a widespread distribution of leptin receptors ⁶. Some clinical and experimental studies have suggested that high leptin levels promote cardiovascular complications. Leptin exerts hypertrophic effects on cardiomyocytes (Iacobellis et al., 2011; Rahmouni, 2010; Rahmouni et al., 2005). Plasma leptin levels have been associated with intima-media thickness of carotid artery in both male and female subjects, irrespective of age and other risk factors (i.e. insulin sensitivity, smoking habits or blood pressure) (Cicccone et al., 2001). In addition, leptin administration triggers atherosclerotic lesions (Bodary et al., 2005) or enhances neointimal formation after vascular injury in mice (Bodary et al., 2007; Schafer et al., 2004). Several mechanisms have been proposed to explain these effects, such as enhancing proinflammatory cytokine production in macrophages and monocytes (interleukin (IL)-6, -12, -18 and tumor necrosis factor -alpha (TNF- α), and promoting vascular smooth muscle cell (VSMCs) migration and proliferation. A prooxidant action has also been found in endothelial cells. In addition, leptin also exerts peripheral actions that could potentially affect cardiac function as a fibrotic factor at renal, cardiac and hepatic level.

HYPOTHESIS.

Circulating and local leptin level increases produced at cardiovascular system levels and associated with body mass increase can participate in obesity-related cardiovascular damage.

Hypothesis foundation

1. Obesity is related to changes in cardiac structure and function characterized by changes in ventricular geometric pattern, diastolic and subsequent systolic dysfunction. These dysfunctions may lead to heart failure.
2. Obesity is related to changes in vascular structure and function characterized by increased arterial rigidity, which may cause changes in vascular function.

3. Obesity leads to increases in the quantity of cardiovascular adipose tissue.
4. Adipokines secreted by adipose tissue have various effects on the cardiovascular system.
5. Increases in the secretion of various adipokines such as leptin may play an important role in obesity-related cardiovascular alterations.

AIMS.

The general aims of the study are to assess possible leptin involvement in obesity-related cardiovascular damage.

The specific aims are as follow:

1. Characterize ventricular geometric pattern and cardiac function in morbidly obese individuals.
2. Determine adipokine expression pattern, circulating inflammation markers and oxidative stress in morbidly obese individuals.
3. Assess the possible role of various adipokine expression changes (especially those of leptin), circulating inflammation markers and oxidative stress in anatomo-functional changes of the heart in morbidly obese individuals.
4. Study the effect of body mass increase on cardiac structure and function in a model of diet-induced obesity.
5. Study the effect of body mass increase on vascular structure and function in a model of diet-induced obesity.
6. Assess the role of leptin in cardiovascular anatomo-functional changes in a model of diet-induced obesity, and likewise assess those mechanisms involved.

METHODS

This clinical study included all patients referred for bariatric surgery. The selection of candidates was performed by a committee that included the endocrinology, general and digestive system surgery, internal medicine, and cardiology departments. Inclusion criteria were age ≥ 18 years and universally accepted indications: long-term obesity

(more than 4 years); body mass index (BMI) ≥ 40 despite other weight loss strategies and BMI ≥ 35 in the presence of obesity-related comorbidities (diabetes mellitus, obesity hypoventilation syndrome, obstructive sleep apnea syndrome, hypertension). Exclusion criteria were age >60 years and unacceptable surgical risk due to concomitant comorbidities. Individuals with normal BMI (≤ 25) were included as controls.

After inclusion by the committee, the patients underwent a cardiovascular examination that included physical examination, 12-lead electrocardiogram (ECG), and transthoracic echocardiogram. The preoperative examination also included anthropometric measurements and blood tests. The protocol was approved by the ethics committee, and all patients signed the informed consent.

Anthropometric Measurements

The height and weight of patients was recorded when taking the echocardiogram, with the patients wearing light clothing and no shoes. We used wall scales. After 10min at rest in a sitting position, a 12-lead ECG was taken and blood pressure was measured in the nondominant arm. BMI was calculated according to the formula: weight (kg)/height squared (meters).

Echocardiogram

Echocardiography studies were performed using a commercially available unit Vivid I[®] (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) equipped with a 2.5MHz probe. Transthoracic echocardiography study was performed according to the recommendations of the European Society of Echocardiography. The mass of the LV in grams was calculated using the Devereaux et al. formula:

In obese patients, left ventricle mass was indexed to the power of 2.7 to minimise the interference of obesity in the estimate of ventricular mass. The relative parietal thickness (RPT) was calculated using the formula:

$$\text{RPT} = (\text{dIVS} + \text{dPW}) / \text{LVTDD}$$

An indexed value LV mass $\geq 51 \text{ g/m}^{2.7}$, for both males and females, and RPT ≥ 0.45 were considered as defining values for concentric hypertrophy.

According to the RPT and the indexed mass for the LV, 4 LV geometric patterns were defined:

1. Normal: RPT < 0.45 and an indexed LV mass $< 51 \text{ g/m}^{2.7}$.
2. Concentric remodeling: RPT ≥ 0.45 and an indexed LV mass $< 51 \text{ g/m}^{2.7}$.
3. Concentric hypertrophy: RPT ≥ 0.45 and an indexed LV mass $\geq 51 \text{ g/m}^{2.7}$.
4. Eccentric hypertrophy: RPT < 0.45 and an indexed LV mass $\geq 51 \text{ g/m}^{2.7}$.

Plasma levels of different markers were performed with a multiplex system following manufacture's indications.

Animals

Male Wistar rats of 150 g (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were fed a high-fat diet (HFD, 33.5% fat; Harlan Teklad #TD.03307, MN, USA; n=8) for 6 weeks. Rats fed a standard diet (3.5% fat; Harlan Teklad #TD.2014, MN, USA; n=8) for 6 weeks were used as a control group. The Animal Care and Use Committee of Universidad Complutense de Madrid approved all experimental procedures according to guidelines for ethical care of experimental animals of the European Community. Body weight was measured once a week. Food and water intake were determined throughout the experimental period. Blood pressure (SBP) was estimated basally and at the end of the study by use of a tail-cuff plethysmograph (Narco Bio-Systems) in unrestrained animals as previously reported ⁷.

Evaluation of cardiac structure and function and aortic composition.

Cardiac structure and function were evaluated by transthoracic echocardiography with an Acuson Sequoia 256 (Siemens Medical Solutions, Germany) connected to a 15-MHz linear transducer in rats anesthetized with isoflurane (2%). 2D-guided M-mode recordings were made from short axis views to measure left ventricular (LV) chamber dimensions, interventricular septum and posterior wall thickness. LV diastolic (LVDA) and systolic (LVSA) areas were measured from the bidimensional parasternal long-axis view. The mean measurements from several consecutive beats were used for data

analysis. LV chamber volumes were calculated using the cylindrical model. This model assumes the ventricle is approximated by a cylinder. Left ventricular ejection fraction (EF) was calculated according to the Teicholz Formula: $(EDD^3 \times 7)/(2.4 + EDD)$ and LV systolic chamber function (pump function) was determined from LV endocardial fractional shortening (FS) $= (LVEDD - LVESD)/LVEDD \times 100$.

Aortic segments were opened longitudinally, the media separated from the adventitia and the medial length measured under a microscope. Media were then defatted, dried and weighed. Insoluble elastin was purified by the hot alkali method and quantified by weighing. Proteins in the NaOH extract were then hydrolyzed, and total medial collagen was quantified by assaying hydroxyproline in the hydrolysate using a colorimetric assay, as previously reported (Calvier et al., 2013).

Histological evaluation

Cardiac and aortic tissue samples and aorta segments were dehydrated, embedded in paraffin and cut with a microtome (Leitz 1512, IMEB INC). Afterwards, four micrometer thick sections were cut placed onto glass microscope slides and stained with picosirius red, hematoxylin and eosin using standard methods. Images from transverse sections were captured using a camera connected to an optical microscope (Leica DM 2000). Media and lumen areas were measured in triplicate and were quantified by planimetry using an morphometrical image analyzer (LEICA Q550 IWB). In order to avoid miscalculation of the data due to possible deformation of the vessels during their preparation, we determined luminal or vessel area by correcting the cross-sectional area enclosed by the internal or external elastic lamina, respectively, to a circle by applying the form factor $l^2/4\pi$ to the measurement of the lamina, where l is the length of the lamina (de las et al., 1999). Media/Lumen ratio was calculated from area data. Media thickness of the aorta was measured in eight-ten different regions with LEICA morphometrical analysis software (LEICA Q550 IWB).

Immunohistological evaluation

Paraffin-embedded aorta sections (5 μ m) were used. Slides were treated with H_2O_2 for 10 min to block peroxidase activity. All samples were blocked with 5% normal goat serum in PBS for 1 h and incubated overnight with fibronectin (Millipore; dilution 1:50) or leptin (Abcam plc; dilution 1:50), washed three times, and then incubated for 30 min

with the horseradish peroxidase-labeled polymer conjugated to secondary antibodies (Dako Cytomation). The signal was revealed by using DAB Substrate Kit (BD Pharmingen) and quantification avoiding signal of adventitial layer using an image analyzer (LEICA Q550 IWB).

Detection of cardiac and aortic superoxide anion production

The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate production of $O_2^{\cdot-}$. Briefly, cardiac and aortic sections (14 μ m) were equilibrated in Krebs-HEPES buffer (in mmol/L: NaCl 130, KCl 5.6, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 0.24, HEPES 8.3, glucose 11, pH 7.4). Fresh buffer containing DHE (5×10^{-3} mmol/L, 30 min, 37 °C) was then added and viewed by fluorescent laser scanning microscope (40X objective in a Leica DMI 3000 microscope) (Ex561 nm and Em610 nm) using the same imaging settings in each case. Quantitative analysis of $O_2^{\cdot-}$ production was performed with MetaMorph Image Analysis Software 7.0 (Molecular Devices Corporation, USA). Three sections per animal were quantified and averaged for each experimental condition. The mean fluorescence densities in the target region were calculated.

Measurement of circulating leptin levels

Plasma leptin levels were measured using a specific quantitative sandwich enzyme immunoassay according to the manufacturer's instructions (Biovendor, Germany).

Isolation of cardiac fibroblast

Non-myocytes from adult male Wistar rats (weighing 250-300 g) were obtained by differential centrifugation of cardiac cells released after retrograde Langendorff perfusion and enzymatic digestion of the hearts, as previously described (Martin et al., 2012). The cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 10 mmol/L L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 10 mmol/L L pyruvate and 2mmol/L HEPES. All assays in the present study were done at temperatures of 37° C, 95% sterile air and 5% CO_2 in a saturation humidified incubator. Cells were treated with different doses of leptin (10-100 ng/ml, BioVendor, Germany) in the presence or absence of either vehicle, melatonin (10^{-3} mmol/L, Sigma), N-acetyllactosamine (LacNac, 10^{-3} mmol/L, Sigma) and rapamycin (10^{-4} mmol/L, Sigma).

Vascular Smooth Muscle Cell Isolation and Culture

Rat aortic VSMCs were isolated from the thoracic aorta of male Wistar rats (250 gr body weight) as previously described (Calvier et al., 2013). The cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS. All assays in the present study were done in the same in vitro conditions (37° C, 95% sterile air and 5% CO₂) in a saturation humidified incubator. VSMCs were used between passages 6 and 7. Cells were seeded into 6-well plates at 90% confluence and serum starved for 12h. Cells were then cultured in the same medium and stimulated with leptin (100 ng/ml, BioVendor, Germany) for 6 hours for mRNA determinations and for 24 hours for protein analysis in the presence or absence of either vehicle, melatonin (10⁻³ mmol/L, Sigma) or LY294002 (2x10⁻⁴ mmol/L). The doses were chosen based in preliminary and previous studies (Lopez et al., 2009; Alvarez et al., 2012)

Real time reverse-transcription PCR

Total RNA was extracted with Trizol Reagent (Euromedex) and purified using the RNeasy kit, according to the manufacturer's instructions (Qiagen). First strand cDNA was synthesized according to the manufacturer's instructions (Roche). Quantitative PCR analysis was performed with SYBR green PCR technology (ABGene) for Coll1a1, Col3a1, Fibronectin, TGF- β , CTGF, galectin-3, leptin and HPRT.

Relative quantification was achieved with MyiQ (Bio-rad) software according to the manufacturer's instructions. Data were normalized by HPRT levels and expressed as percentage relative to controls. All PCRs were performed at least in triplicate for each experimental condition.

Western Blot

Aliquots of 20 μ g of proteins from cardiac homogenates, aortas, cardiac fibroblasts and VSMCs were separated by SDS-PAGED on 10% polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Hybond-P; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Membranes were incubated with primary antibodies for each of the following: collagen type I (AbD Serotec; dilution 1/1000), fibronectin (Millipore; dilution 1/500), collagen type III (Santa Cruz; dilution 1/500), elastin (Abcam plc; dilution 1/500), transforming growth factor (TGF- β ; Abcam plc; dilution 1/1000); connective tissue growth factor (CTGF; Torrey Pines Biolabs Inc; dilution

1/1000); galectin-3 (Epitomics; dilution 1/1000); phosphorylated and total Akt (Cell signaling; dilution 1/500); phosphorylated p70S6 kinase and total p70S6 kinase (Santa Cruz, CA; dilution 1/1000) and β -actin (Sigma; dilution 1/10000) as a loading control. After washing, membranes were incubated with an HRP-linked secondary antibody. Signals were detected using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech). Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units. All Western Blots were performed at least in triplicate for each experimental condition.

Measurement of intracellular superoxide anion production

Cells were incubated from different times (6-24 hours) with either vehicle or leptin (10-100 ng/ml). Cells were then incubated with 5×10^{-3} mmol/L DHE for 30 minutes in a light-protected humidified chamber at 37°C. Cells were subsequently washed with warm PBS and analyzed with a 40X objective in a fluorescent laser scanning Leica DMI 3000 microscope. Cells were also incubated 24 hours with leptin (100 ng/ml) in the presence or absence of either vehicle, melatonin (10^{-3} mmol/L), rapamycin (10^{-4} mmol/L), N-acetyllactosamine (LacNac, 10^{-3} mmol/L) or LY294002 (2×10^{-4} mmol/L).

For each condition 150-200 cells were analyzed with a 40X objective under transmitted light microscope. A single researcher unaware of the experimental groups performed the analysis. Three different assays were each performed in quintuplicate.

Data Analysis

The results of the clinical study, continuous variables are expressed as mean \pm standard deviation or median (interquartile interval) in case of asymmetry. Categorical variables are expressed in absolute values and percentages. In the experimental studies, variables are expressed as mean \pm SEM. The differences between categorical variables were analyzed using the chi-square test. The Student's t-test or the ANOVA test was used for continuous variables. Normality of distributions was verified by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Differences in distributions of LV geometric patterns were analyzed using McNemar's test $\times 2$ for correlated samples. The differences between continuous variables before and after bariatric surgery were analyzed using the Student's t-test for correlated samples or the corresponding nonparametric test, as appropriate. Using the "improvement" category of the LV

geometric pattern as a reference, we calculated the effects on the clinical variables through the coefficients of a linear regression model that included the preoperative baseline value of the same variable (ANCOVA). The beta correlation coefficients, along with their 95% confidence intervals (95%CI), were obtained using a linear regression model. A value of $P < .05$ was used as the cut-off value for defining statistical significance. Data analysis was performed using the statistical program SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS.

Clinical Study:

The epidemiological characteristics were similar between both groups with a mean age of the group of morbidly obese patients of 42.1 ± 10.3 years and of the controls of 41.4 ± 5.1 years, the average BMI of the obese subjects was $46.4 \pm 5.4 \text{ kg/m}^2$, while that of the controls was $22.8 \pm 1.9 \text{ kg/m}^2$. The 85.4 % of obese subjects had associated comorbidities. The most frequent of these were hypertension (47.7 %), dyslipidemia (40.3 %) and smoking (30 %). Only the 20.8 % of patients were diabetic. Some 15.4 % of the obese patients presented hypoventilation syndrome.

Both mean systolic and diastolic blood pressure were higher ($p < 0.0001$) in obese subjects as compared to control subjects. With regard the metabolic profile, obese subjects showed elevated levels of LDL-cholesterol ($p = 0.007$) and triglycerides ($p < 0.0001$) than the group of control subjects. A similar situation was observed in glucose and insulin levels and as a consequence in HOMA index that was 3 times greater (2.4 ± 2.8 vs. 0.8 ± 0.3) in obese than controls, indicating insulin resistance.

Forty one percent of patients with morbid obesity had normal left ventricle geometric pattern as compared to normal control subjects, which were 77.3 %. The remaining 59% of the obese patients had some form of ventricular remodeling, the most frequent being eccentric hypertrophy (which was present in 25% of obese individuals), and concentric hypertrophy (in 19.4 % of the cases). Only 1.5 % of the cases of control subjects had ventricular hypertrophy. No significant differences were observed between the two groups either in volume per beat or in the cardiac output while the left ventricle ejection

fraction was lower in obese (68.2 ± 7.8 vs. 72.7 ± 5.1 %; $p < 0.0001$) than in controls. Regarding diastolic function, the average value of the E/A ratio was significantly lower in the obese group than in control subjects (1.19 ± 0.4 vs. 1.5 ± 0.5 ; $p < 0.0001$), at the expense of an increase in A-wave ($p < 0.0001$). Mitral annulus velocities by Doppler tissue imaging, e' wave was lower in the obese subjects than in controls (9.6 ± 2.8 vs. 13.2 ± 2.6 cm/s; $p < 0.0001$). The E/e' ratio was, therefore, greater ($p < 0.0001$) in the obese group than in the control one.

Obese patients showed an elevation in circulating levels of leptin ($p < 0.0001$) and a decrease in the adiponectin ones ($p < 0.05$). Furthermore, we observed an increase in inflammatory mediators such as CRP, PAI-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α and MCP-1 (except for the case of IL-10). Higher levels of GLP-1, MMP-9, MPO and NTproBNP were also observed in obese subjects as compared to control ones..

We analyzed the relationship between geometric pattern or diastolic function and clinical and echocardiographic variables, as well as plasma markers studied, with the intention of explaining the presence of ventricular hypertrophy or diastolic dysfunction observed in obese subjects using a logistic regression model or linear, respectively. The presence of ventricular hypertrophy is mainly explained by the presence of obesity ($p < 0.0001$), the circulating levels of leptin ($p < 0.0001$) and the ratio E/e' ($p < 0.05$). In the case of diastolic dysfunction, we found that both, the circulating levels of leptin and TNF- α ($p < 0.0001$) are the two main variables that explain the presence of diastolic dysfunction.

Experimental model:

Animals fed a HFD for 6 weeks showed a significant increase in body weight (26%), a slight (14,2%) but significant increase in relative heart weight. As expected, the HFD group showed an increase in plasma levels of both triglycerides (40%) and total cholesterol (31%), as well as an increase in HOMA index (3 fold) as compared to the control group suggesting insulin resistance. HFD showed also higher plasma leptin levels (69.4 ± 16.2 vs. 12.5 ± 1.8 ng/ml; $p < 0.01$) than control ones in the absence of changes in blood pressure.

HFD rats showed an increase in the ratio of media / lumen of both, descending coronary artery and the aorta due to an increase in the media area since no changes were

observed in the lumen area ($p < 0.01$). No differences were observed in LV diameter, posterior wall or septum thickness between rats fed a HFD and controls. EF and FS were also similar in both groups.

Cardiac and aortic protein levels of leptin were also higher in obese animals than in controls ($p < 0.05$; $p < 0.01$ respectively) but no difference was found in adiponectin levels. Diet-induced obese animals show an increase in interstitial fibrosis in comparison to controls as demonstrated by the higher total collagen ($p < 0.001$). This increase is mainly due to an accumulation of insoluble one ($p < 0.001$), in the HFD group.

As compared with animals fed a control diet, rats fed a HFD showed higher protein levels of collagen type I ($p < 0.05$). HFD rats also showed a reduction of MMP-2 protein levels ($p < 0.05$) but not changes in the those of its inhibitor, TIMP-1 and -2, suggesting a reduction in its activity and in consequence, less collagen degradation than in controls.

At cardiac level, rats fed a HFD showed higher protein levels of galectin-3 and TGF- β ($p < 0.05$), but similar levels of CTGF. At vascular level, they showed an increase in proteins levels of TGF- β ($p < 0.01$) and CTGF ($p < 0.05$) without changes in those of either collagen type III, elastin or galectin-3. In the same way, HFD group showed a significant increase in fibronectin aortic protein levels ($p < 0.05$).

In addition, we found a positive correlation between cardiac and aortic protein leptin levels and total collagen content, collagen type I, MMP-2 and TGF- β protein expression.

We evaluated oxidative stress in the hearts and in the aorta of these animals. DHE fluorescence intensity was higher in heart ($p < 0.05$) and aorta ($p < 0.01$) from HFD animals than in controls, suggesting a higher cardiac and vascular production of $O_2^{\cdot -}$ in the obese animals than in controls. These effects were accompanied by activation in the aorta, but not at cardiac level, of PI3K/Akt pathway due to an increase in the phosphorylation of Akt ($p < 0.01$) in HFD group as compared to control rats.

In order to verify the direct effects of leptin on cardiac and vascular fibrosis and the molecular mechanism involved, we explored the effects of leptin on cardiac myofibroblasts and on vascular smooth muscle cells (VSMCs). Leptin (10-100 ng/ml) induced an increase in collagen type I synthesis in a dose- and time-dependent manner, reaching the maximum at 24 hours and 100 ng/ml in cardiac myofibroblasts ($p < 0.001$).

In the same way, leptin (100 ng/ml) was able to produce a significant increase in Colla1 ($p<0.05$) and fibronectin ($p<0.01$) at mRNA levels in VSMC. These results were confirmed at protein level since after 24 hours of stimulation, leptin (100 ng/ml) produced an increase in collagen type I and fibronectin on VSMCs ($p<0.01$).

The profibrotic effect of leptin in VSMCs and cardiac myofibroblasts involved the stimulation of different mediators. Leptin (100 ng/ml) was able to increase TGF- β and CTGF protein levels after stimulation in both types of cells. In addition, leptin (100 ng/ml) was able to produce a significant increase in TGF- β ($p<0.05$) and CTGF ($p<0.01$) in VSMCs at mRNA levels. Although leptin was not able to modify galectin-3 protein or mRNA levels in VSMCs, the presence of leptin (100 ng/ml) was able to increase galectin-3 levels in cardiac myofibroblasts.

Leptin also increased superoxide anion production in a dose- and time-dependent manner, as suggested by a stepwise increase in fluorescence intensity, which reached the maximum at 24 hours for cardiac myofibroblasts and 6 hours for VSMCs and thus showing the prooxidant effect of leptin ($p<0.001$).

Leptin (100 ng/ml) was able to increase the phosphorylation of P70S6K in cardiac myofibroblasts and Akt in VSMCs ($p<0.01$) for 24 hours. To determine whether oxidative stress is involved in the fibrotic effect induced by leptin and the potential role of PI3K/Akt/mTOR pathway in this participation, cardiac myofibroblasts and VSMCs were exposed to the antioxidant agent, melatonin (10^{-3} mmol/L). Cardiac myofibroblasts were also exposed to rapamycin, a specific mTOR inhibitor (10^{-4} mmol/L), and VSMCs were exposed to LY294002 (2×10^{-4} mmol/L), a specific inhibitor of PI3K/Akt pathway in presence of leptin (100 ng/ml) for 24 hours. In cardiac myofibroblasts, melatonin and rapamycin were able to reduce ($p<0.001$) collagen type I production in leptin-treated cells. Similarly, the presence of melatonin or rapamycin was able to reduce the observed increases in TGF- β and CTGF protein levels induced by leptin ($p<0.01$). As expected, melatonin reduced the ROS production induced by leptin ($p<0.001$). In addition, a reduction in ROS production was also observed in rapamycin-treated cells ($p<0.001$).

In VSMCs, both melatonin and LY294002 were able to reduce the increment in collagen type I ($p<0.05$), fibronectin, TGF- β and CTGF ($p<0.01$) induced by leptin. Furthermore, the presence of melatonin in leptin-treated cells reduced the

phosphorylation of Akt ($p < 0.01$), thereby showing that oxidative stress could mediate the activation of Akt pathway in leptin-treated cells. In addition, the treatment of VSMCs with LY294002 for 6 hours in presence of leptin (100 ng/ml) was not able to reduce the increase in the intensity of fluorescence induced by leptin, which demonstrates that PI3K/Akt pathway does not mediate the prooxidant effect of leptin.

Finally, in order to explore the potential role of galectin-3 on the effects of leptin, cardiac myofibroblasts were exposed to the galectin-3 inhibitor; LacNac (10^{-3} mmol/L). Inhibition of galectin-3 reduced collagen type I levels in leptin-treated cells ($p < 0.01$). The inhibition of galectin-3 was also able to reduce the ROS production induced by leptin ($p < 0.05$). In addition, the presence of melatonin or rapamycin was able to reduce the observed increases in galectin-3 protein levels induced by leptin ($p < 0.05$).

DISCUSSION.

Several studies have demonstrated the deleterious effects of obesity on health, and especially on the cardiovascular system. Obesity increases the risk of suffering cardiovascular complications. In fact, obesity is associated with changes in the structure and function of both heart and vascular system that can eventually trigger heart failure and vascular dysfunction. This increased risk of morbid-mortality cardiovascular is explained, in part, through the association amongst obesity and other comorbidities such as hypertension, dyslipemia and diabetes. These cardiovascular risk factors, by themselves, can exert deleterious effects on the cardiovascular system. The progressive increase in the prevalence of obesity has been accompanied by an increase in the incidence of hypertension, and it is estimated that between 60-70% of the risk for high blood pressure development may be attributable to obesity (Kotchen, 2010). In this sense, our data show that patients with morbid obesity have higher levels of blood pressure. In fact almost 50% of the patients were hypertensives. Some of the mechanisms underlying the development of hypertension in obese subjects include sodium retention, an increase activity of both sympathetic nervous system and the renin-angiotensin-aldosterone system and endothelial dysfunction. In addition, it has been suggested that the presence of other risk factors, including insulin resistance/diabetes, can trigger blood pressure level elevation in obese patients through alterations of vascular function. Our results support this idea since the obese patients showed insulin

resistance as suggested by the increase in the HOMA index, this being 20.8 % of patient diabetics.

In agreement with previous studies, our results show that morbid obesity is associated with changes in the structure and geometry of the left ventricle since 59% of subjects had some form of cardiac remodeling. The remodeling is mainly due to an increase in left ventricular mass since nearly 75% of the subjects with cardiac remodeling show ventricular hypertrophy, with the most frequent being the eccentric one. Several determinants can participate in the ventricular geometry changes in obesity including preload, afterload and the duration of the disease. In addition, the presence of other comorbidities, mainly hypertension, can also participate. However, although almost 50% of our patients were hypertensive, high blood pressure levels seem not to be a major determinant of the development of ventricular hypertrophy. Similarly, the presence of other cardiovascular risk factors such diabetes or dislipemia did not seem to explain the ventricular hypertrophy in morbidly obese subjects in our patients. In fact, the data suggest that obesity per se, as well as the circulating levels of leptin, are the two major factors that explain the ventricular hypertrophy in morbidly obese subjects. The mechanism underlying leptin participation in cardiac remodeling are unclear but, as will be discussed below, its profibrotic and prooxidant effects could explain this participation. This could exert itself in a paracrine way since this adipokine can be locally produced in the heart not only by the adipose tissue but also by cardiac cells.

We have also detected abnormalities in the diastolic function, with 41% of patients showing E/A ratio <1. Diastolic dysfunction in morbid obesity is due to increased blood flow and circulating volume, along with ventricular hypertrophy. In this sense, our results support that the presence of ventricular hypertrophy explains the diastolic dysfunction in obese patients, although the main factor explaining the change in diastolic function in this group of patients seems to be circulating levels of leptin, as well as some mediators of inflammation such as the TNF- α . The potential mechanisms underlying this participation are not well established but a proinflammatory-prooxidant environment induced by these factors, which can favour the development of fibrosis could be major determinants.

Taking into account the results of the clinical study supporting a role of leptin in the development of the cardiac structural and functional alterations observed in the obese

patients, we decided to develop an animal model of obesity induced by diet, with the purpose of studying the structural changes mainly generated not only in heart, but also in aorta and explore the possible mechanisms involved.

Our data suggest that in a model of diet-induced obesity in rats, leptin can participate in the cardiovascular damage associated with obesity through the modulation of the ECM as suggested by the fact that the increased circulating and cardiac leptin levels observed in obese animals were accompanied by an increase in interstitial fibrosis. In fact, a positive correlation was found between cardiac leptin protein levels and collagen content. More importantly, leptin stimulated collagen type I production in cardiac myofibroblasts from adult rats.

Similarly, leptin can act as a modulator of the ECM at vascular level. This effect seems to be selective to certain components and not a general action of leptin on the ECM since, while this adipokine was able to stimulate collagen type I and fibronectin, it was not able to stimulate either collagen type III or elastin in VSMCs. Moreover, the high leptin levels observed in the aorta of obese animals were closely related to levels of both total collagen content and collagen type I protein. Therefore, these data support that leptin exerts a profibrotic effect in the heart and aorta, which seems to involve the modulation not only of its synthesis but also its degradation because HFD animals show higher protein levels of collagen type I and lower levels of MMP-2 than controls, which were positively and a negatively correlated with cardiac and aortic leptin protein levels, respectively. Consequently, together with data supporting the participation of leptin in hepatic and renal fibrosis (Han et al., 2001; Marra et al., 2011; Wolf and Ziyadeh, 2006), our data further build on the idea of leptin as a key inductor of organ fibrosis.

The increase in ECM can contribute to cardiac hypertrophy in obese animals since alterations in the composition and structure of the ECM can make an important contribution to changes in cardiac remodeling (Yamamoto et al., 2011; Wachtell et al., 2007; Brower et al., 2006), which leads to myocardial stiffness, decreased left ventricular compliance and, ultimately, diastolic dysfunction and cardiac failure⁸.

It is generally believed that the composition of the ECM is a critical determinant of arterial stiffness (Diez, 2007; Lacolley et al., 2002). Therefore, the observed increment in collagen type I and fibronectin without changes in collagen type III and elastin, clearly suggest matrix stiffness and consequent arterial stiffness in obese

animals. In this sense, it has been previously reported that weight and fat distribution is related to arterial stiffening (Sutton-Tyrrell et al., 2001). Therefore, the data point to the participation of leptin in vascular stiffness associated with obesity. High circulating leptin levels have also been associated with impaired arterial distensibility in healthy adolescents. This association was independent of other confounding factors such as fat mass, blood pressure and insulin resistance (Singhal et al., 2002).

The profibrotic factors TGF- β and its downstream mediator, CTGF, seem to play a role in leptin-induced ECM, because the presence of leptin increased their production in VSMCs and cardiac myofibroblasts. This role is further supported by the fact that both TGF- β and CTGF levels were positively correlated with leptin and collagen levels in the heart and in aorta of obese rats. Little information has been reported regarding the interactions between either TGF- β or CTGF and leptin. In diabetic rats, high leptin plasma levels were accompanied by a higher expression of TGF- β in left ventricle and an increase in coronary perivascular fibrosis (Chen et al., 2007; Yu et al., 2004). Some data have also indicated that fibronectin synthesis can be stimulated by TGF- β and CTGF in different cell types.

Increased galectin-3 expression induces cardiac fibroblasts to proliferate and synthesize collagen type I contributing to myocardial fibrosis. In fact, recent studies have suggested a role of galectin-3 in the myocardial fibrosis in response to angiotensin II and aldosterone (Martin et al., 2012; Azibani et al., 2012). Our study supports a wider participation of galectin-3 as a central player in the fibrotic effect of a variety of factors, since it also participates in the fibrotic effect induced by leptin. This affirmation is based on two facts: first, the parallel increase in collagen type I and galectin-3 in response to leptin in cardiac myofibroblasts and second, the inhibition of galectin-3 activity by LacNac reducing the collagen type I synthesis induced by leptin. Moreover, the increased cardiac interstitial fibrosis observed in obese animals was accompanied by an increase in galectin-3 cardiac levels in HFD rat. However, in the present study, galectin-3 seems not to play an important role in the vascular fibrosis associated with obesity.

The mechanism involved in the fibrotic effect of leptin seems to involve the activation of PI3K/Akt/mTOR pathway and oxidative stress. The participation of PI3K/Akt/mTOR pathway is suggested by two facts. First, a higher activation of

PI3K/Akt/mTOR pathway was also observed in VSMCs and cardiac myofibroblasts after leptin exposure and second, the presence of its inhibitors, rapamycin and LY294002, were able to prevent the leptin-induced production of collagen type I and fibronectin. Similarly, PI3K/Akt pathway has been involved in the hepatic fibrotic effect of leptin (Zhou et al., 2009), as well as in controlling food intake and energy balance⁹. These data suggests that PI3K/Akt act as a general pathway involved in leptin actions.

At cardiac level, leptin activates mTOR, as suggested by the increase in the phosphorylation of p70S6K, its downstream mediator in cardiac myofibroblasts. Similarly, the activation of this pathway is associated with cardiac fibrosis in different cardiac pathologies (Wu et al., 2009; Yu et al., 2013; Aoyagi et al., 2012). Therefore, the data suggest that leptin triggers the activation of mTOR, which initiates the production the ROS and finally mediates collagen synthesis. A connection between ROS and mTOR activation in the induction of cardiac fibrosis has already been reported in ECM production after myocardial infarction or left ventricle hypertrophy in rats (Xu et al., 2008; Schenkel et al., 2010; Schenkel et al., 2012). In addition, previous studies have reported a cross talk between mTOR and leptin in cardiomyocyte hypertrophy, neointimal hyperplasia, control of energy balance as well as in the regulation of lipid metabolism and inflammation (Zeidan et al., 2011; Rodriguez et al., 2011; Maya-Monteiro and Bozza, 2008; Shan et al., 2008).

Similarly, the role of PI3K/Akt pathway in the fibrotic effect of leptin on VSMCs seems to be triggered by ROS production because the presence of melatonin reduced both collagen type I and fibronectin productions, and also prevents leptin-induced PI3K/Akt activation in VSMCs. In agreement with these observations different studies have reported an interaction between ROS and the activation of PI3K/Akt pathway in different experimental conditions (Urtasun et al., 2012). In this study, the activation of ROS induced by leptin was observed at the same time in which induced the gene expression of Col1a1 and fibronectin. The activation of ROS was not affected by the presence of LY294002, thus supporting that PI3K/Akt pathway is unable to further stimulate ROS in VSMCs. Oxidative stress- PI3K/Akt pathway could modulate the potential role of leptin in the vascular fibrosis observed in obese rats since the increase in aortic leptin levels were accompanied by an increase in both ROS production and PI3K/Akt activation in the aorta.

In summary, our results support the idea of a causative link between leptin and fibrosis in diet-induced obesity in rats. This is based on the fact that collagen and fibronectin deposition were associated with elevated levels of leptin in the heart and in vessels of these animals, and by the fact that leptin induces the synthesis of collagen type I and fibronectin in cells through mechanisms that are also activated in obese animals such as ROS-PI3K/Akt/mTOR pathway and consequent galectin-3, TGF- β and CTGF production. This profibrotic-prooxidant effect induced by leptin could be relevant from the pathophysiological point of view since this adipokine can be locally produced in the heart and aorta and its production is triggered by obesity.

Perspectives

Obesity exerts an important impact on the cardiovascular system which has consequences on its structure and function. The present study shows that fibrosis seems to be an early event that occurs together with obesity even before functional changes are evident. This process can lead to myocardial and arterial stiffness and could predispose to the cardiovascular alterations associated with obesity. Besides other metabolic factors (insulin resistance) that can also favour the development of fibrosis, leptin locally produced in heart or in aorta could participate in this process by increasing collagen production. This profibrotic effect could explain the association observed in obese patients between leptin levels and ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction. These results highlight the relevance of the adipokine leptin in the cardiovascular consequences of obesity. These findings would shed some light on whether blockade of excessive leptin production might have beneficial effects in the clinical setting.

CONCLUSIONS

1. In morbidly obese individuals, there is a change in ventricular geometric pattern primarily due to excentric hypertrophy.
2. In morbidly obese individuals, there is diastolic dysfunction which is independent of hemodynamic load conditions.

3. Ventricular geometric pattern in morbidly obese individuals is determined by the presence of leptin and the obesity itself.
4. Diastolic dysfunction in morbidly obese individuals is determined primarily by circulating leptin levels, as well as TNF- α levels and the presence of ventricular hypertrophy.
5. In a model of diet-induced obesity is associated with structural changes in the cardiovascular system characterized mainly by an increase in interstitial fibrosis due to insoluble collagen. These structural changes appear early on and occur prior to the appearance of functional changes.
6. The hyperleptinemia observed in obese animals is accompanied by a rise in local leptin levels at cardiac and vascular levels.
7. Leptin participates in cardiac and vascular fibrosis through a prooxidant action and consequent activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway.
8. Galectin-3 modulates the profibrotic and prooxidant effects of leptin at cardiac level in obese animals.

Introducción

I. OBESIDAD.

I.1. Definición, clasificación y diagnóstico.

La obesidad se define como una enfermedad crónica multifactorial caracterizada por un aumento de la masa grasa, y por lo tanto del peso corporal, como consecuencia de un balance energético positivo mantenido en el tiempo. Aunque no todo incremento de peso corporal es debido a un aumento del tejido adiposo, en la práctica cotidiana el concepto de obesidad se relaciona con el peso corporal.

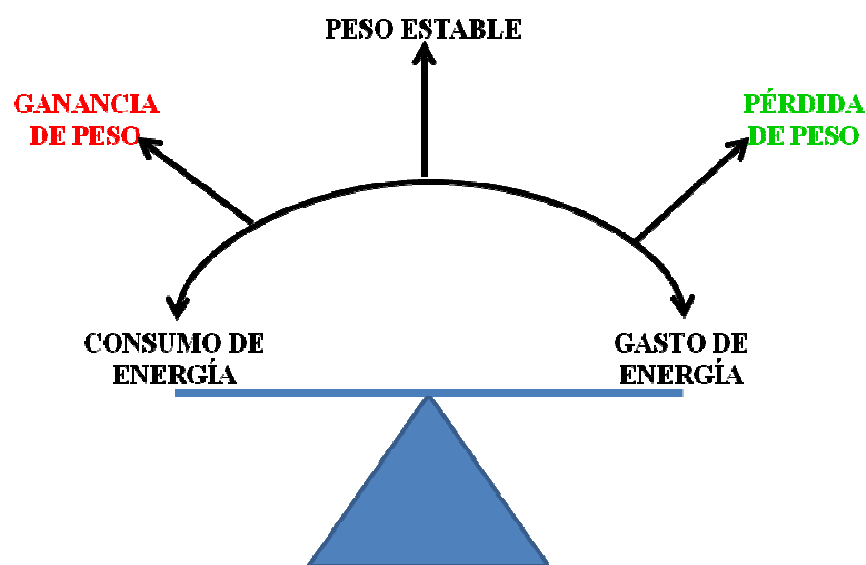


Figura 1: Cambios en el peso corporal determinados por el equilibrio entre el consumo de energía y el gasto de energía (calorías ingeridas vs. consumidas).

No sólo es importante el peso corporal total a la hora de definir la obesidad. El porcentaje de grasa corporal y su distribución en determinados lugares anatómicos del organismo están relacionados con la morbilidad e incluso con la mortalidad a largo plazo, y se consideran un factor de riesgo importante para presentar determinadas enfermedades físicas crónicas y por las repercusiones emocionales y psicopatológicas que representan.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto una clasificación cuantitativa de sobrepeso y obesidad basada en el Índice de Masa Corporal (IMC), que en la actualidad es el índice más difundido, tanto en la clínica como para realizar

estudios epidemiológicos, ya que es uno de los métodos más sencillos, reproducibles y capaces de reflejar la adiposidad en la mayoría de la población. Se trata de un índice que relaciona el peso del individuo expresado en kilogramos con la altura de dicho individuo, expresada en metros elevada al cuadrado.

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kilos)}}{\text{talla}^2 \text{ (metros)}}$$

Categoría	Valores límite del IMC (Kg/m ²)
Peso insuficiente	<18,5
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad de tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	>50

Tabla 1: Criterios SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad) para definir la obesidad en grados según el IMC en adultos.



Figura 2: Grados de obesidad según el IMC.

Recientemente se ha definido un índice alternativo al IMC como es el Índice de Adiposidad Corporal (IAC) que refleja de una forma mucho más precisa el porcentaje de grasa acumulada y es útil tanto en hombres como en mujeres de distintas razas.

$$\text{IAC} = \frac{\text{Diámetro cadera (cm)}}{[\text{talla}^{1,5} \text{ (metros)}] - 18}$$

Este nuevo índice se ha creado a partir del examen de 1700 estadounidenses de origen mexicano cuya grasa corporal se evaluó a través de densitometría. Con los datos de la densitometría, los investigadores intentaron obtener la misma información a través de la combinación de distintas variables como el peso, la altura, el sexo, la edad o el perímetro abdominal y de cadera (Bergman, 2012).

Existen otros criterios para clasificar la obesidad:

Criterio celular: Se basa en el número y en el tamaño de los adipocitos:

Hiperplásica: Se debe a un aumento del número de células. Este tipo de obesidad suele aparecer en épocas de crecimiento, considerándose responsable de la obesidad infantil y del adolescente.

Hipertrófica: Se produce un aumento del tamaño celular, en particular de los adipocitos, siendo este tipo el principal responsable de la obesidad en el adulto.

Criterio anatómico: Se basa en la cantidad y en la localización predominante de los depósitos grasos.

Obesidad difusa o de clase I: Caracterizada por el exceso de grasa corporal total sin que se produzca una concentración específica de tejido adiposo en alguna región corporal.

Obesidad central o de clase II: También se denomina obesidad androide por considerarse típica de varones y caracterizada por el exceso de grasa subcutánea en la región abdominal (tipo manzana) y en el tronco. Es una obesidad fundamentalmente hipertrófica, la grasa es visceral y es altamente sensible a la lipólisis inducida por catecolaminas. Esta obesidad suele asociarse a intolerancia

a la glucosa, hipertrigliceridemia, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y enfermedad arterial coronaria.

Obesidad glúteo-femoral o de clase III: También se denomina obesidad ginoide por considerarse típica de mujeres y caracterizada por el exceso de grasa preferentemente en la región glúteo femoral (tipo pera). Es una obesidad hiperplásica y poco sensible a la lipólisis. Suele asociarse a litiasis biliar, tromboflebitis e hiperinsulinemia.

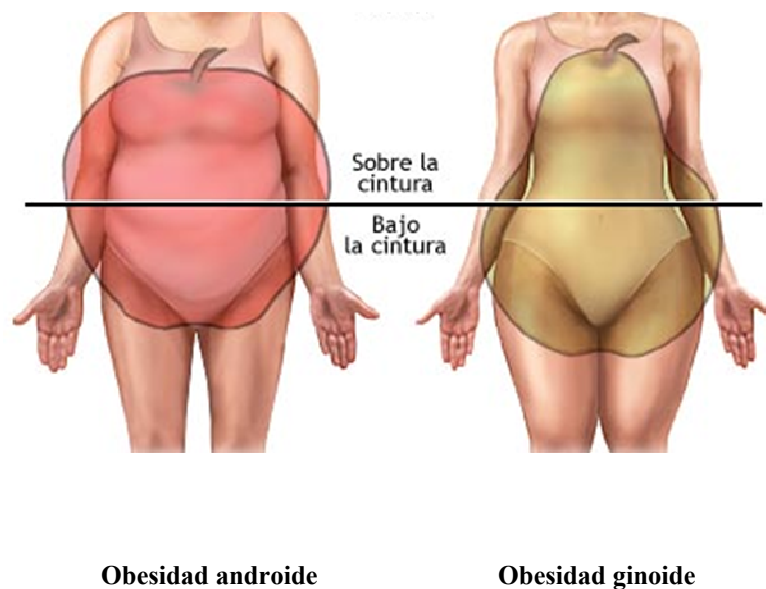


Figura 3: Tipos de obesidad según criterio anatómico.

1.2. Datos epidemiológicos.

La obesidad es la enfermedad metabólica más prevalente del mundo occidental y de importancia creciente en los países en desarrollo, llegando a considerarse la pandemia del siglo XXI. En los últimos años se han obtenido datos epidemiológicos que demuestran el incremento de la prevalencia del proceso que ha pasado a ocupar un lugar preocupante entre los causantes de más altos costes sociosanitarios. La obesidad supone un coste anual de 70 billones de dólares en EE.UU., de los que sólo se destinan a investigación 34 millones.

En la declaración de Milán, realizada en el 9º Congreso Europeo de Obesidad, celebrada en Julio de 1999, se estimó que la prevalencia de la obesidad entre la población adulta de Europa estaba alrededor del 15%, lo que representaba unos 5-6

millones de personas, y reconocía que algunas áreas geográficas la tasa alcanzaba el 40-50%.

Según la Encuesta Nacional de Salud de España de 2003, la prevalencia de obesidad (IMC mayor o igual de 30 kg/m²) en la población de 20 y más años de edad es 13,7%, sin diferencias sustanciales entre los dos sexos en la prevalencia global (Informe Sociedad Española de Arteriosclerosis 2007). Sin embargo, la frecuencia de obesidad resultó mayor en los varones hasta los 44 años de edad, y a partir de ahí fue ligeramente superior en las mujeres. En ambos sexos, la prevalencia de obesidad aumenta con la edad hasta los 65 años.

En el ámbito internacional, con datos autodeclarados, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en España están en una posición media-alta entre los países de la Unión Europea (Institute of European Foods Studies, 1999). Entre los niños, los españoles junto a los de otros países mediterráneos, presentan las mayores prevalencias de obesidad de Europa (Lobstein and Frelut, 2003). Asimismo, en todos los países con datos disponibles, incluida España, la prevalencia de obesidad está aumentando.

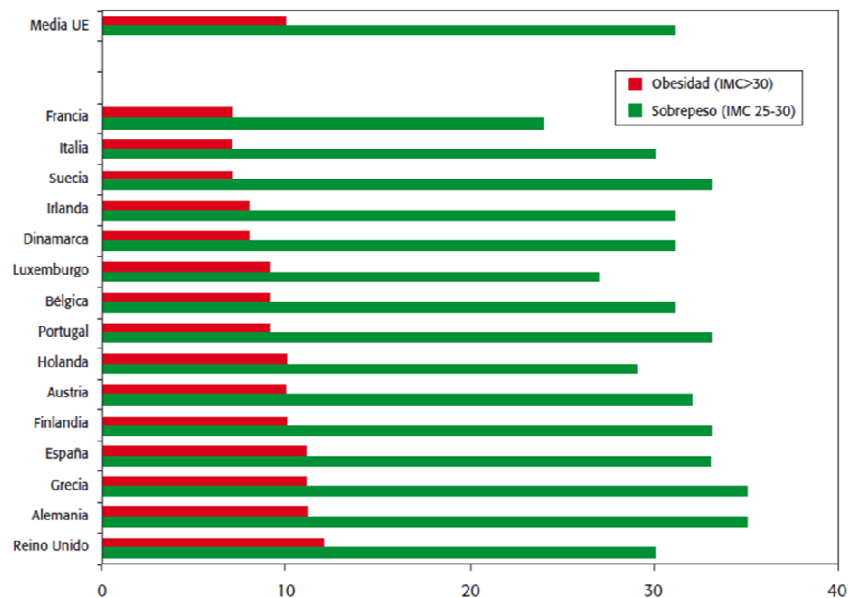


Figura 4: Datos epidemiológicos de sobrepeso y obesidad en diferentes países de la Unión Europea. Fuente: Institute for Food Studies, 2003.

Se ha descrito un incremento continuo y gradual del riesgo relativo de mortalidad conforme aumenta el IMC (Manson et al., 1995), y por tanto se trata de una enfermedad importante en términos sanitarios y económicos. La obesidad es un factor de riesgo para enfermedades como la hipertensión arterial, diabetes mellitus, ictus y cardiopatía isquémica cuyos costes asistenciales son muy elevados; siendo la patología cardiovascular y la diabetes mellitus las comorbilidades con mayor consumo de recursos, pudiendo llegar al 80% del coste total. La magnitud de esta epidemia moderna ha hecho surgir diversos intentos de hallar los costes económicos efectivos derivados de esta enfermedad, con el objetivo de identificar y medir los costes directos en términos de asistencia sanitaria y los costes indirectos (por mortalidad prematura o bajas laborables). Se ha estimado que el coste total de la obesidad y su influencia negativa sobre la salud, supone a nivel mundial del 2 al 7% del gasto sanitario. En 1995 en EE.UU. se estimaba que los costes económicos de la obesidad eran de unos 70000 millones de dólares, superando los costes directos de la enfermedad coronaria (50800 millones), hipertensión arterial (15600 millones) y diabetes mellitus (53200 millones). En España se estima que el coste económico de la obesidad derivado de los costes directos e indirectos es de unos 2000 millones de euros anuales.

I.3. Factores etiológicos.

Entre la diversidad de factores que contribuyen a la etiología de la obesidad están los genéticos, los ambientales, los nutricionales y la actividad física. Todos ellos pueden contribuir, de una u otra manera, al desequilibrio entre la ingesta de energía y el gasto de energía que favorece la acumulación de grasa; sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos a través de los cuales actúan estos factores (Pi-Sunyer, 1993):

Factores genéticos: Los hijos de padres obesos tienen de 3 a 8 veces más probabilidades de ser obesos. No está claro si existe una influencia genética o familiar, aunque lo más probable es que estos dos factores jueguen un papel preponderante, atribuyéndose entre un 64-88 % de las variaciones a factores genéticos.

Ingreso energético: La hiperfagia parece ser la causa principal en modelos animales, pero en los humanos no parece ser tan simple. Es probable que existan

personas con señales defectuosas que registran la saciedad, o que tienen centros insensibles para la recepción de estas señales. También se ha sugerido, que el comportamiento al ingerir los alimentos es aprendido y la saciedad es un reflejo condicionado.

Algunos estudios sobre los hábitos alimentarios de los sujetos obesos muestran que por lo general tienden a abusar de alimentos ricos en lípidos, que por tener una elevada densidad energética y no existir una regulación adecuada de una comida a otra, a diferencia de las proteínas y los hidratos de carbono, favorecen su depósito en forma de grasa corporal (Flatt et al., 1985).

Factores endocrinos: Una posible explicación de algunas formas de obesidad se encuentra en el desequilibrio hormonal primario, que al afectar el comportamiento alimentario, el gasto de energía, o ambos, da por resultado un balance energético positivo, con el consiguiente almacenamiento de la energía en el tejido adiposo. En muchos pacientes obesos se han observado varios cambios en el funcionamiento endocrino; en la mayoría de los casos estos desarreglos son consecuencia más que causa de la obesidad.

Entre las alteraciones endocrinas que se asocian con el desarrollo de obesidad se encuentra el síndrome de ovarios poliquísticos, el hiperinsulinismo, el síndrome de Cushing y el hipotiroidismo, entre otros, aunque hay que destacar que proporcionalmente ocupan un sitio pequeño en la prevalencia de obesidad en la población.

Factores metabólicos: Se ha postulado que una anomalía metabólica básica podría incrementar el almacenamiento energético en el tejido adiposo y producir obesidad por varios caminos:

- a) La desviación preferente de los sustratos energéticos hacia la síntesis y el almacenamiento de los triglicéridos.
- b) El aumento de la eficiencia para degradar los hidratos de carbono, los ácidos grasos y los aminoácidos, y almacenar la energía adicional en forma de triglicéridos en el tejido adiposo.

c) Una mayor eficiencia para efectuar trabajo fisiológico, lo que da por resultado una situación en la que se requiere menos energía y el exceso de ésta se convierte en triglicéridos, que se almacenan en el tejido graso.

d) La inhibición de la movilización de la energía almacenada en forma de triglicéridos en el tejido adiposo.

En otras palabras, se podría catalogar al individuo con obesidad como un sujeto con una eficiencia del metabolismo energético superior al promedio habitual (Sims, 1976). A pesar de que existen evidencias que apoyan esta hipótesis, todavía no están muy claras las vías metabólicas que podrían estar afectadas.

Estilo de vida: Los cambios recientes en el estilo de vida, caracterizados por un consumo excesivo de energía y una reducción notable en la actividad física, ofrecen una explicación razonable de la etiología de la obesidad. La disminución en los patrones de actividad física en los países desarrollados, e incluso en las naciones en vías de desarrollo, han contribuido de manera notable al escalamiento del problema de la obesidad. Entre las razones de esta situación están la disminución de la actividad física en gran número de trabajos, los equipos automatizados que ahorran trabajo físico y la disminución en el tiempo de ocio.

Factores sociales: Los datos epidemiológicos indican que la prevalencia de obesidad recibe una notable influencia de los factores sociales, económicos, raciales y otros relacionados con el estilo de vida. Lejos está la obesidad de distribuirse de manera uniforme en la sociedad. En los países desarrollados representa un serio problema de salud pública, aunque también los países de economías menos privilegiadas tienen altas prevalencias de obesidad. En general se ha encontrado una relación inversa entre el estado socioeconómico y la prevalencia de obesidad, aunque este fenómeno es más pronunciado en las mujeres. En el estudio NHANES de Estados Unidos se ha observado que los individuos que se encuentran por debajo de la línea de pobreza extrema, tienen una mayor prevalencia de obesidad. Sin embargo, la abundancia económica también trae como consecuencia un estilo de vida que favorece el desarrollo de obesidad.

I.4. Bases moleculares de la obesidad.

El cuerpo humano tiene un requerimiento constante de energía que obtiene de los alimentos. Parte de los nutrientes que ingerimos son usados de inmediato y otra gran parte de ellos se almacenan para la obtención de energía en los períodos de ayuno. El tejido adiposo es el órgano con mayor capacidad para guardar energía, la cual se almacena en forma de triglicéridos (TG). Un exceso en el almacenaje de TG es el causante de obesidad, uno de los mayores problemas de salud actuales. La obesidad es una enfermedad multifactorial en la que participan componentes genéticos, programación fetal, hábitos, forma de vida y factores ambientales. Este padecimiento es, por su origen, una enfermedad del tejido adiposo, por lo que el conocimiento de este tejido, su metabolismo y sus funciones en condiciones normales resultan de fundamental importancia para el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad.

Los TG pueden provenir de la dieta o bien pueden ser sintetizados a partir de otros metabolitos, principalmente azúcares, mediante el proceso denominado lipogénesis. Los TG se almacenan en el tejido adiposo. Cuando se requiere de energía, éstos son hidrolizados por la vía metabólica denominada lipólisis. Durante la lipólisis, los TG almacenados en el tejido adiposo se hidrolizan en ácidos grasos y glicerol. La hidrólisis la lleva a cabo una enzima llamada lipasa sensible a hormonas. Los ácidos grasos y el glicerol formados en la lipólisis se liberan a la circulación y son oxidados en otros tejidos mediante el proceso de β -oxidación.

Los TG son también sintetizados de novo a partir de carbohidratos por el proceso de lipogénesis. La glándula mamaria, el músculo, el hígado y tejido adiposo, efectúan el proceso de lipogénesis, pero estos dos últimos tejidos, es en donde esta vía tiene como fin la regulación del balance energético del organismo.

La lipogénesis a partir de carbohidratos utiliza la vía de la glucólisis para producir piruvato, éste a través de la acción catalítica del complejo piruvato deshidrogenasa se convierte en acetil-CoA y subsecuentemente en citrato en la mitocondria. A través de un transportador en la membrana mitocondrial el citrato sale del orgánulo hacia el citoplasma donde es transformado por la enzima citrato lipasa, en acetil-CoA. La enzima acetil-CoA carboxilasa añade un carbono en forma de grupo carboxilo y transforma a este compuesto de 2 carbonos en un compuesto de tres carbonos llamado malonil-CoA, molécula que constituye el núcleo básico en la síntesis de los ácidos grasos. El malonil

CoA se une a la proteína transportadora de acilos (ACP), en esta forma el malonil-CoA se conjuga con una molécula de acetil-CoA para formar acetoacetil-ACP, quién a través del proceso de β reducción y de la posterior conjugación con el bloque básico, el malonil-CoA, forma un ácido graso con mayor número de carbonos, este paso se repite hasta formar ácidos grasos de cadena larga (palmitato). Tres ácidos grasos de cadena larga son entonces esterificados con una molécula de glicerol para formar triacilglicerol, más comúnmente llamado TG.

Los ácidos grasos son una fuente de energía muy importante para el hígado, la corteza renal, el corazón y el músculo esquelético en reposo. Los ácidos grasos son oxidados en el proceso denominado β -oxidación principalmente en la mitocondria, y una pequeña fracción de ácidos grasos se oxida en los peroxisomas. Durante el ayuno la oxidación de lípidos representa casi un 70% de la energía. La β -oxidación mitocondrial es cuantitativamente la mayor vía oxidativa de los ácidos grasos cortos, medianos y largos.

I.5. Obesidad y enfermedad cardiovascular.

Son muchos los estudios que muestran que individuos obesos experimentan una elevada morbi-mortalidad de origen cardiovascular que incluyen infarto de miocardio, fallo cardíaco congestivo (Lakka et al., 2001; Clark, 2003). Se han postulado diferentes mecanismos que vinculan la obesidad con las enfermedades cardiovasculares. El tejido adiposo es un importante órgano endocrino y paracrino que libera un amplio número de citoquinas y de mediadores bioactivos como leptina, adiponectina, interleuquina (IL)-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que influyen no solamente en la homeostasis del peso corporal, sino que también en la resistencia a la insulina, diabetes, niveles lipídicos, tensión, coagulación, fibrinólisis, inflamación y aterosclerosis (Lau et al., 2005).

En un análisis llevado a cabo tras 26 años de seguimiento a participantes del Framingham Heart Study, se concluyó que la obesidad es un predictor independiente de enfermedades cardiovasculares que incluyen enfermedad cardíaca coronaria, muerte coronaria e insuficiencia cardíaca congestiva, tanto en hombres y mujeres, y accidente cerebrovascular en las mujeres después de ajustar por factores de riesgo (Hubert et al.,

1983). Tal es así la asociación de la obesidad con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, que se ha observado como una reducción moderada del peso corporal (10%) genera efectos beneficiosos sobre la prevención o el tratamiento de hipertensión, diabetes y dislipemias (Orzano and Scott, 2004).

La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia son signos característicos de la obesidad. La obesidad es un factor de riesgo mayor para diabetes mellitus donde más del 80% de pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente o tipo 2 son obesos.

La resistencia a la insulina en la obesidad compromete a la mayoría de los tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa, incluyendo hígado, músculo y grasa. Las bases moleculares para la resistencia a la insulina son multifactoriales. Se ha identificado una disminución del número de receptores de la insulina y su función, y defectos post-receptor causados por un mal acople entre hormona y receptor.

Un posible mediador de la resistencia a la insulina en obesidad es el aumento de los niveles de ácidos grasos libres, los cuales inhiben la utilización de la glucosa estimulada por insulina en el músculo, estimulando el gasto de glucosa hepática e inhibiendo la depuración plasmática de insulina. El aumento de ácidos grasos libres induce la resistencia hepática a la insulina; debido a que los adipocitos intraabdominales son más activos, desde el punto de vista lipolítico, que los de localización subcutánea (Graham et al., 2006).

La tensión arterial aumenta o disminuye en función del peso. Los mecanismos por los cuales la obesidad genera hipertensión incluyen la resistencia a la acción de la insulina, la retención de sodio, un incremento de la actividad del sistema nervioso simpático, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, y una función vascular alterada. Existen datos que asocian al tejido adiposo con la presión sanguínea. Un tejido adiposo disfuncional en la obesidad está hipertrofiado y se caracteriza por un incremento en la infiltración de macrófagos y por cambios en la secreción de distintas adipoquinas.

Durante la obesidad ocurre una retención renal de sodio, a pesar de que hay un aumento en la tasa de filtración glomerular, lo que indica un aumento en la reabsorción tubular de sodio renal. Los motivos principales para esta retención de sodio son el aumento del tono simpático renal y la activación del sistema renina-angiotensina (Kotchen, 2010). La hipertensión durante la obesidad se caracteriza por un volumen intravascular

expandido asociados con incrementos en el volumen cardio-pulmonares y con el gasto cardiaco (Rocchini, 1992).

La dislipemia se desarrolla a medida que aumenta el IMC con un incremento de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Este efecto, junto con una disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un aumento en la concentración de TG, incrementa el riesgo de sufrir enfermedad coronaria 3,6 veces (Wannamethee et al., 1998). Es por eso que obesidad representa un papel muy importante como factor de riesgo de enfermedad coronaria, incluyendo hipertensión arterial, dislipidemia, diabetes y es el mayor componente del síndrome metabólico. La obesidad es un factor de riesgo independiente de aterosclerosis y eventos coronarios (Talayero and Sacks, 2011).

I.5.1. Obesidad y remodelado cardiaco.

Muchos estudios han mostrado que la obesidad se asocia con cambios tanto funcionales como estructurales en el corazón. Muchos de estos cambios como la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la dilatación de la aurícula izquierda y el deterioro de la función diastólica se cree que son precursores de formas más evidentes de disfunción cardiaca e insuficiencia cardiaca. Por ello se asume que la obesidad con el tiempo favorece el desarrollo de insuficiencia cardiaca. Un subestudio del Estudio Framingham en el que se estratificaron los participantes por el IMC se observó que había una asociación entre el IMC y el incremento del riesgo de padecer fallo cardiaco tanto en hombres como en mujeres y que ese riesgo aumentaba en función del aumento del IMC (Kenchiah et al., 2004).

I.5.2. Cambios estructurales en el corazón durante la obesidad.

En sujetos obesos se ha observado que ocurre una hipertrofia cardiaca definida como un incremento del tamaño completo del corazón o como un incremento de las cámaras cardiacas relativas al tamaño corporal (de et al., 1994). En cuanto a la hipertrofia del ventrículo izquierdo existen controversias. Hay autores que muestran como la obesidad se asocia independientemente con la hipertrofia del ventrículo izquierdo (Avelar et al., 2007a; Berkalp et al., 1995a). Otros autores, por el contrario, hablan de que la masa del

ventrículo izquierdo aumenta de manera proporcional al tamaño corporal y que por tanto no se puede hablar de hipertrofia (Iacobellis et al., 2002). Estudios recientes realizados en sujetos jóvenes y mayores con obesidad en los cuales no hay evidencias de enfermedad cardiovascular, se ha visto mediante técnicas de imagen que existe una hipertrofia del ventrículo izquierdo y que se acompaña por un aumento en el grosor de la pared del ventrículo (Avelar et al., 2007). De hecho, se ha comprobado cómo hay un predominio de hipertrofia cardiaca excéntrica en donde hay un mayor incremento del volumen de la cámara frente al grosor de la pared. A pesar de ello, existen contradicciones, ya que estudios recientes, tanto ecocardiográficos como con resonancia magnética cardiaca, han encontrado mayor prevalencia de los patrones concéntricos (Turkbey et al., 2010).

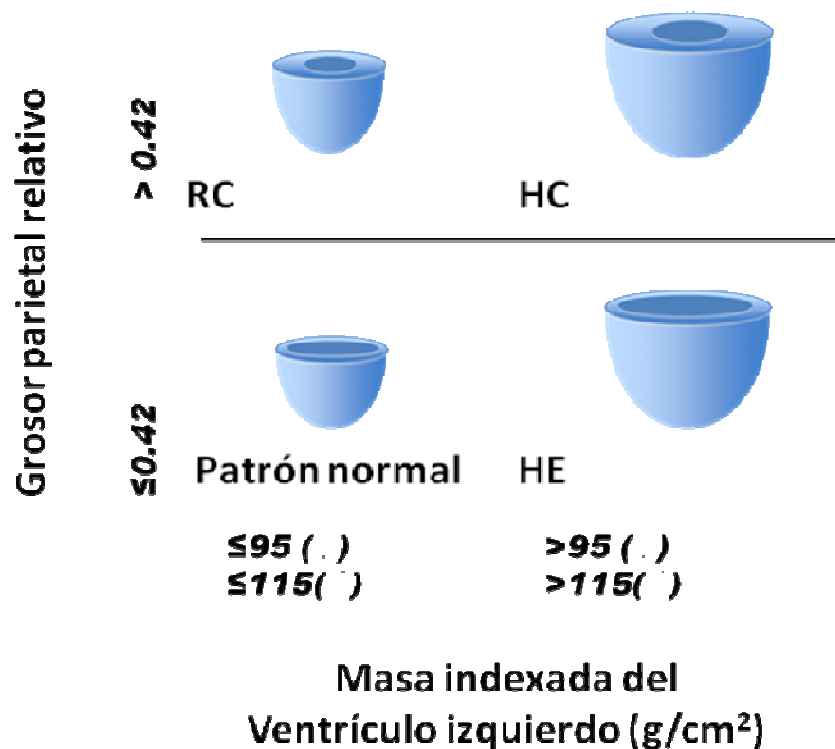


Figura 5: Esquema de cambios estructurales en el corazón. Tipos de hipertrofia.

Se ha postulado que el incremento de la masa cardiaca es el resultado de un incremento de la grasa epicárdica y de una infiltración de ácidos grasos en el corazón (Alexander, 1985). En este sentido, hay estudios que muestran que la cantidad de grasa epicárdica se acompaña de manera paralela a la cantidad de tejido adiposo visceral y se correlaciona con la severidad de la hipertrofia del ventrículo izquierdo (Iacobellis and Leonetti, 2005). El grupo de *Peterson y col.* vieron como en sujetos obesos, particularmente aquellos que tenían resistencia a la acción de la insulina, tenían un incremento en la ingesta y en el uso de ácidos grasos en el corazón (Peterson et al., 2004).

No sólo se han observado cambios en el ventrículo izquierdo durante la obesidad. También se ha visto que en individuos obesos hay un incremento en el tamaño de la cavidad del ventrículo derecho y en el grosor de su pared (Wong et al., 2006) y también de las dimensiones de la aurícula izquierda (Wang et al., 2004).

En distintos modelos animales como en ratones, ratas, conejos y perros también se ha observado que en situaciones de obesidad se da una hipertrofia del ventrículo izquierdo (Carroll et al., 1999; Villa et al., 1998), aunque se ha visto que estos resultados son muy dependientes de la edad del animal. La patogénesis de la hipertrofia cardiaca es compleja e involucra distintos factores coexistentes como hipertensión, el volumen sanguíneo y la activación del sistema nervioso simpático. Es común encontrar en los modelos animales de obesidad una acumulación de TG en el corazón (Thakker et al., 2006). La acumulación de estos TG y de metabolitos lipídicos como ceramidas se han asociado con apoptosis de cardiomiocitos en ratas Zucker (Zhou et al., 2000). Esta acumulación de TG representan un marcador de daño cardiaco, pero no son necesariamente un mediador de lipotoxicidad (Listenberger and Schaffer, 2002).

La hipertrofia cardiaca encontrada en los animales obesos, a menudo se asocia con un incremento en la fibrosis intersticial (Cloward et al., 2003). Esta fibrosis se suele correlacionar con el incremento en la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), con niveles elevados del factor de crecimiento transformante (TGF)- β y con un incremento en la activación de vías de estrés como JNK. Asimismo, la respuesta fibrótica observada en animales obesos es debida en parte a la activación local del sistema renina-angiotensina.

I.5.3. Cambios funcionales en el corazón durante la obesidad.

Los hallazgos encontrados en la fracción de eyección de los individuos obesos son muy dependientes de la edad y de la técnica utilizada para evaluarla. Se ha descrito que la duración de la obesidad determina el desarrollo de disfunción diastólica, de la que dependen las propiedades elásticas y de relajación del corazón y, eventualmente, puede llegar a ocurrir disfunción sistólica e insuficiencia cardiaca franca (Alpert et al., 1995). La disfunción diastólica observada en individuos obesos es debida a un aumento en el flujo y en el volumen circulante sanguíneo, junto con la hipertrofia ventricular. En este sentido un estudio realizado en nuestro grupo con pacientes con obesidad mórbida observamos un claro beneficio de la pérdida de peso conseguida a través de la cirugía bariátrica en cuanto a la estructura y geometría del ventrículo izquierdo. La pérdida de peso genera efectos beneficiosos sobre la función diastólica, pero siempre en cuanto a parámetros dependientes de las condiciones hemodinámicas como son las ondas E y A, el tiempo de relajación isovolumétrico y el tiempo de deceleración mitral (Di, V et al., 2008). En este sentido, en nuestro estudio no sólo no hemos encontrado mejoría, sino que hemos hallado una discreta reducción en la velocidad del anillo mitral medido por Doppler tisular. Este resultado indica daño intrínseco miocitario, que no sería reversible a pesar de la normalización de otros aspectos estructurales del ventrículo izquierdo (Luaces et al., 2012).

Es necesario considerar el empleo de anestesia y el tipo de anestesia utilizado en modelos animales, ya que supone una variable que puede influir en los resultados obtenidos de las ecocardiografías y en algunas diferencias encontradas con los hallazgos en humanos. La mayoría de los estudios han encontrado cambios en la función sistólica que es dependiente de la edad del animal (Buchanan et al., 2005a; Christoffersen et al., 2003). Por el contrario, pocos estudios han visto cambios en la función diastólica (Semeniuk et al., 2002). De los estudios en modelos animales se puede dilucidar que los cambios en la función cardiaca son dependientes de los efectos secundarios de la obesidad y de la intolerancia a la glucosa generada (Verreth et al., 2004).

Los efectos encontrados en modelos *in vivo* son más pronunciados en corazones aislados donde se ha visto una reducción en la función cardiaca (Buchanan et al., 2005). En estos corazones, el tratamiento con agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)- α y γ son capaces de mejorar el metabolismo

cardiaco, pero no necesariamente restauran la función cardiaca (Carley et al., 2004). Estos resultados muestran que alteraciones en el metabolismo cardiaco son cambios que pueden contribuir a modificaciones tanto en la estructura como en la función del corazón, pero no los únicos. Existen otros mecanismos que pueden contribuir a estos cambios en el corazón como son el estrés oxidativo y la inflamación que serán explicados más adelante.

I.5.4. Obesidad y remodelado vascular.

La obesidad es un predictor independiente de enfermedades vasculares. Durante la obesidad se genera una deposición de grasa perivascular alrededor del corazón y de sus ramas principales. Este incremento de tejido adiposo alrededor de los vasos sanguíneos genera una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias y de compuestos profibróticos, permitiendo la aparición de inflamación y de aterosclerosis. Estos procesos generan un incremento en el grosor de la íntima-media y un descenso de la distensibilidad arterial (Gustafson, 2010). La activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y del sistema nervioso simpático en el síndrome metabólico generan un incremento de la vasoconstricción coronaria, que contribuye significativamente al desequilibrio entre el flujo sanguíneo coronario y el metabolismo del cardiaco (Knudson et al., 2007). Estudios experimentales han demostrado que, incluso en estadios tempranos de la obesidad, hay una reducción en la relajación coronaria dependiente de endotelio (Galili et al., 2007).

Los síndromes coronario agudos son generalmente provocados por la ruptura o por la erosión de la placa ateromatosa. Cuando la placa rompe, el factor tisular endotelial es expuesto a la circulación sanguínea y activa la cascada de la coagulación generando la formación de trombos (Darvall et al., 2007).

Como se ha comentado anteriormente, la obesidad se asocia con hipertensión. En este sentido, existe un estudio que muestra como el 10 kg de exceso en el peso corporal, se asocian con el incremento de 3 mm Hg en la presión arterial sistólica y 2.3 mm Hg en la presión arterial diastólica (Poirier et al., 2006).

La respuesta compensatoria normal a un gasto cardíaco elevado, que debe ser una caída en la resistencia vascular periférica, se ve obstaculizada en pacientes obesos con

hipertensión, exhibiendo una resistencia periférica inapropiadamente normal (Reisin and Jack, 2009). Diversos estudios han demostrado que un incremento en la actividad del sistema nervioso simpático, junto con una hipoactividad del sistema nervioso parasimpático, generan un aumento en la prevalencia de hipertensión debido a una mayor retención de sodio y a una hipertrofia del músculo esquelético vascular, afectando la entrega de glucosa a los músculos y el aclaramiento de lípidos posprandial (Morse et al., 2005; Sorof et al., 2002; Yakinci et al., 2000).

La activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona a la hipertensión generada en individuos obesos. El tejido adiposo es capaz de sintetizar los componentes de dicho sistema, incrementando además la producción de citoquinas proinflamatorias y profibróticas (Morse et al., 2005; Wassink et al., 2007). La angiotensina II, la elevación de los niveles plasmáticos de aldosterona y el incremento de dichas citoquinas son capaces de estimular por sí mismas la vasoconstricción, la proliferación de células de músculo liso vascular y la disfunción endotelial (Hadi et al., 2005).

I.5.5. Obesidad y disfunción endotelial.

La obesidad tiene importante repercusiones hemodinámicas como un incremento en el volumen total sanguíneo y un mayor gasto cardíaco que es causado en parte por un incremento de tejido adiposo que es muy sensible a la hipoxia y de la demanda metabólica inducida por el exceso del peso corporal (Alpert et al., 1997).

El endotelio vascular es particularmente sensible a la obesidad. El incremento en los AGL juega un papel central en la disfunción endotelial observada en los individuos obesos que se caracteriza por una disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO) (Arcaro et al., 1999). Niveles elevados de AGL conllevan a un deterioro de mecanismos independientes de NO debido a una reducción en la vasodilatación mediada por potasio (de Kreutzenberg et al., 2003). Se ha visto que mujeres obesas tienen un peor reclutamiento capilar y una peor vasodilatación mediada por acetilcolina tanto en situaciones normales como en situaciones de hiperinsulinemia. Estos efectos están correlacionados con la sensibilidad a la insulina y negativamente correlacionados con la presión sanguínea (de Jongh et al., 2004).

Estudios experimentales han mostrado como el ácido oleico inhibe la síntesis de NO en células endoteliales de arterias pulmonares (Lu et al., 1996). Los ácidos oleico y linoleico incrementan la proteína quinasa C (PKC), y la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) las cuales afectan negativamente tanto al tono vascular como al crecimiento celular (Lu et al., 1998). La activación de PKC permite la activación de la NADPH oxidasa, y la generación de especies reactivas de oxígeno, que están asociadas con la activación de ERK, factores transcripcionales y una disminución de la función endotelial al aumentar la degradación de NO. Otro posible mecanismo que puede perjudicar la vasodilatación en individuos obesos es la reducción de prostaciclina (PGI₂) inducida por niveles elevados de AGL. Los AGL inhiben de manera dosis-dependiente la síntesis de PGI₂ (Jeremy et al., 1983).

Por tanto, en la obesidad, el incremento de AGL no sólo antagoniza el uso de glucosa mediante la alteración de la señalización del receptor de la insulina, sino que también afecta a la señalización endotelial del NO.

Debido a todo ello, el tejido adiposo juega un papel central en el desarrollo de disfunción endotelial observada en individuos obesos. Incrementos en el tamaño y en el número de adipocitos parece que producen disfunción celular ya que un excesivo acumulo de lípidos genera disfunción mitocondrial y del retículo endoplasmático produciendo un estado proinflamatorio, resistencia a la insulina y una elevada producción de AGL (de and Mozaffarian, 2008). Además del tejido adiposo, la grasa en el hígado contribuye a la síntesis de mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva (PCR), la IL-6 y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). La PCR se correlaciona con el IMC y con la acumulación de grasa visceral (Darvall et al., 2007). La PCR inhibe la formación de NO por células endoteliales. La falta de NO genera vasoconstricción, adherencia de leucocitos, activación plaquetaria, oxidación y trombosis, generando disfunción endotelial e hipertensión arterial (de and Mozaffarian, 2008; Sutherland et al., 2004). El NO posee propiedades antiaterogénicas debido a su función de vasodilatación, a su efecto antiproliferativo de células de músculo liso y a su capacidad para disminuir la adhesión de monocitos y de agregación de plaquetas en el endotelio (Skilton and Celermajer, 2006).

I.5.6. Mecanismos que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Son muchos los mecanismos que se dan en la obesidad y que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, pero probablemente los dos mecanismos más importantes son la secreción de citoquinas proinflamatorias y un aumento de estrés oxidativo.

En las últimas décadas se ha probado como el incremento de masa grasa se asocia con inflamación. Se ha postulado que la muerte de adipocitos por necrosis puede desencadenar el reclutamiento de macrófagos y comenzar el proceso de inflamación (Cinti et al., 2005). La nutrición está implicada en la activación del sistema inmune. Un exceso de energía puede provocar una respuesta inflamatoria debido a una expansión de la masa grasa. Esta expansión genera incrementos en los niveles de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y otros factores proinflamatorios (Wellen and Hotamisligil, 2005). Un incremento en los niveles de AGL también pueden contribuir a una inflamación sistémica y afectar a la acción de la insulina. Estudios recientes muestran que los AGL ejercen sus acciones sobre las vías inflamatorias a través de los receptores tipo Toll 4 (TLR4), los cuales juegan un importante papel en la inflamación y en la inmunidad (Shi et al., 2006). Del mismo modo, existen similitudes estructurales entre los ácidos grasos saturados y los lipopolisacáridos (LPS) que pueden explicar los efectos estimulatorios de los AGL sobre los TLR4. Los AGL también son capaces por sí solos de inducir de manera directa una respuesta proinflamatoria en el músculo esquelético, efecto que se revierte mediante el ejercicio físico (Schenk and Horowitz, 2007). El reconocimiento de AGL por TLR4 puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, y la activación de TLRs expresada por adipocitos en respuestas inflamatorias generadas por el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Ajuwon and Spurlock, 2005).

La mayoría de las citoquinas proinflamatorias secretadas por la masa grasa son capaces de inducir por ellas mismas resistencia a la acción de la insulina. Por ejemplo, el TNF- α puede contribuir a la resistencia sistémica de la insulina. El TNF- α activa la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) que conlleva a una inhibición de la señalización de la insulina. La obesidad genera un aumento en la actividad de NF- κ B, que en el tejido

adiposo blanco provoca un descenso en la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP1), permitiendo un descenso de la termogénesis e incrementando el grado de la obesidad.

La interleuquina-6 (IL-6) también juega un papel central en todo este proceso ya que es la principal inductora de la producción hepática de proteína C reactiva (PCR) (Pepys and Hirschfield, 2003)- Al igual que la IL-6, otra proteína importante es la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Ratones deficiente en el receptor de MCP-1 son resistentes a efectos adversos de una dieta rica en grasa y muestran un descenso en la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, reducen la producción de adipocitoquinas y desarrollan una menor esteatosis hepática (Weisberg et al., 2006).

Un efecto adicional de los AGL sobre los mecanismos proinflamatorios es su capacidad para disminuir genes que están involucrados en la función mitocondrial, como el coactivador- 1 α del receptor activado de proliferación de los peroxisomas γ (PGC-1), su incremento en la biosíntesis de ceramidas y la inhibición del transporte de glucosa estimulada por insulina.

Además de la asociación que existe entre obesidad e inflamación, la obesidad también causa estrés en el retículo endoplasmático que genera resistencia a la insulina, y una producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Hotamisligil, 2007). En pacientes con resistencia a la acción de la insulina, o con obesidad o ambos, el denominador común que permite el daño cardiovascular es el estrés oxidativo. La hipótesis de los radicales libres postula que las EROs generan una modificación inespecífica de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales contribuyen a la etiología de las enfermedades vasculares en pacientes diabéticos (Jay et al., 2006). La mitocondria es la principal fuente de EROs. Los AGL pueden modular la producción mitocondrial de EROs por distintos mecanismos como la generación de EROs en la cadena transportadora de electrones, también impiden el paso de glutation oxidado a glutation reducido impidiendo la eliminación de H₂O₂ y también son capaces de favorecer la producción de EROs en la β -oxidación (Schonfeld and Wojtczak, 2008).

El incremento plasmático en la concentración de AGL no solo se asocia con un incremento en la actividad de NF- κ B en células mononucleares, sino que también se asocia con la generación de EROs (Tripathy et al., 2003). La estimulación de altas concentraciones de palmitato a células de músculo liso y a células endoteliales

incrementó la producción de radicales libres, además de verse un incremento en los niveles de diacilglicerol y de la actividad de PKC (Inoguchi et al., 2000). El incremento en la producción de EROs por parte de los AGL se ha observado en distintos tipos de células como en células de músculo liso, cardiomiocitos y adipocitos, y en la mayoría de los casos esta producción de EROs ocurre en el interior de la mitocondria. En este proceso juega un papel importante el incremento observado en la actividad de la NADPH oxidasa.

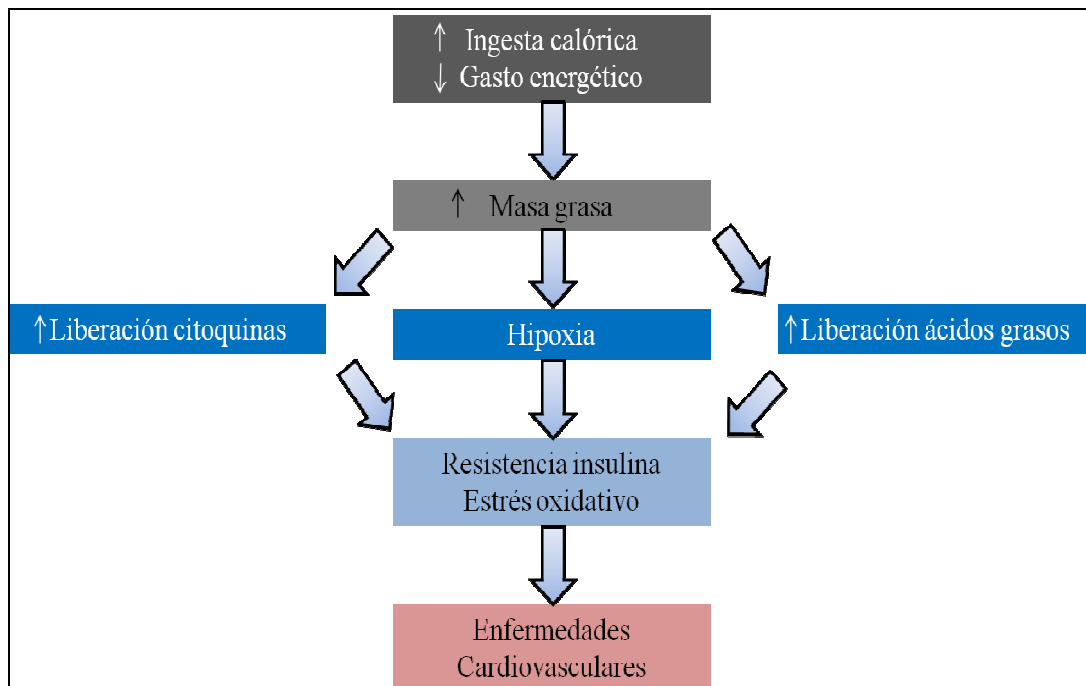


Figura 6: Consecuencias de la obesidad sobre mecanismos que contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

I.6. Modelos animales en obesidad.

Nuestros conocimientos sobre los efectos de la obesidad se deben en gran parte a los estudios realizados en animales. En los últimos 15 años se han hecho grandes progresos en esta área desde el descubrimiento de la leptina, hormona derivada de los adipocitos (Zhang et al., 1994a), y su receptor (Tartaglia et al., 1995; Lee et al., 1996), ambos descubiertos mediante la caracterización del defecto genético en ratones mutantes (ratones *ob/ob* y *db/db*). El descubrimiento de la leptina desencadenó una explosión de actividad en el campo de la regulación del balance energético, siendo este

descubrimiento, en su totalidad, resultado del trabajo con animales. Sin embargo, la importancia crítica de utilizar modelos animales para entender las regulaciones del consumo de energía y el equilibrio energético es de varias décadas anteriores al descubrimiento de la leptina. Algunos ejemplos clave son el descubrimiento de la insulina, hormona reguladora pancreática, a principios del siglo pasado, que fue en gran parte el resultado del trabajo con perros; señales de saciedad provenientes del intestino como el péptido YY (PYY) y la colecistoquinina (CKK).

Tradicionalmente se han utilizado mucho los modelos animales con mutaciones génicas para el estudio de la obesidad. No obstante, estas modificaciones génicas son poco frecuentes en el ser humano, por lo que resultan poco representativos de lo que sucede en la obesidad humana (Boudina and Abel, 2007). Una alternativa al uso de estos animales es el uso de modelos de obesidad inducido por dieta que permite obtener un fenotipo obeso mediante la administración de una dieta rica en grasas durante un determinado periodo de tiempo. El éxito de este modelo está influido por múltiples factores como el sexo, la cepa animal, la edad, la composición de la dieta o el tiempo de administración de la dieta.

Es muy importante conocer el tipo de grasa presente en la dieta. En rata, el consumo a corto plazo (8 semanas) de grasas saturadas promueve la apoptosis de cardiomiocitos al aumentar la síntesis de ceramidas en los mismos. Sin embargo, el consumo de grasas insaturadas no es causa de apoptosis del cardiomiocito (Okere et al., 2006). En animales con administración de una dieta rica en grasa se ha podido ver en función del tiempo de administración de la dieta una disfunción del ventrículo izquierdo (Ouwens et al., 2005). El estudio en ratones con obesidad inducida por dieta se ha visto que el consumo a corto plazo (2 semanas) de una dieta rica en grasas saturadas conlleva al incremento del peso corporal, de los tejido adiposos y de la secreción de leptina (Van et al., 1997). Otro estudio ha mostrado que la administración de dieta rica en grasa durante 3 semanas en ratones genera resistencia a la acción de la insulina en hígado, músculo esquelético, corazón y tejido adiposo y se asocia además con un contenido graso en músculo esquelético y en hígado (Park et al., 2005).

Han sido muy empleados modelos animales con modificaciones genéticas. Los ratones *ob/ob* (Zhang et al., 1994) y *db/db* (Bahary et al., 1990) y la rata Zucker obesa (*fa/fa*) son casos clásicos de las mutaciones espontáneas de pérdida de función en un

único gen que generan obesidad. Al caracterizar las bases genéticas de las mutaciones se reveló que el defecto en los ratones *ob/ob* se debe a la supresión de un único par de bases, y al producto génico se le dio el nombre de leptina. Las mutaciones de ratones *db/db* y ratas *fa/fa* resultaron ser mutaciones en el receptor de leptina. Aunque este descubrimiento supuso un gran avance, los cribados genéticos en la población humana han mostrado que un ínfimo número de individuos tienen mutaciones por pérdida de función en este gen (Farooqi and O'Rahilly, 2005).

No solo se han empleado ratones modificados genéticamente en la leptina. En este sentido también se desarrolló un ratón con alteraciones en el receptor de la hormona de crecimiento (SMA-1). Por sus características, estos animales tienen alguna relevancia en el estudio de la obesidad, ya que su fenotipo implica un cuerpo pequeño debido a la limitación del crecimiento, junto con un aumento importante en la cantidad de tejido adiposo (Meyer et al., 2004).

Se ha creado un gran número de modelos transgénicos y knockout (KO) con fenotipos obesos y delgados desde la caracterización de los primeros genes de la obesidad. Un ejemplo de animales KO utilizados para el estudio de la obesidad son los ratones *axl*, desarrollado originalmente para determinar si el receptor tirosina quinasa, *axl*, tenía algún papel en la leucemia. Estos animales presentan hiperglucemia e hiperinsulinemia, una severa resistencia a la insulina y obesidad progresiva. Se vio que en estos animales se daban elevaciones sistémicas del TNF- α , que contribuye de manera indirecta al desarrollo de obesidad.

Además de los modelos KO globales y sobre un tejido específico, la modificación genética también comprende modelos “knock-in”, que reemplazan el gen endógeno por una mutación. Por ejemplo, los ratones *s/s* se desarrollaron para investigar el papel de las señales de leptina individuales mediante la introducción de una mutación knock-in que alteraba el patrón de señalización intracelular dominante a través del que se creía que la leptina tenía su principal función (el patrón STAT3) (Bates et al., 2003). Se halló que los ratones *s/s* presentaban similitudes con los *db/db*, al mostrar un desarrollo temprano de la obesidad, caracterizado por polifagia y niveles elevados de leptina e insulina, lo que sugiere resistencia a la leptina. Sin embargo, la restricción calórica normalizaba el control glucémico en los ratones *s/s*, que mostraban una mejora en la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa.

Un problema importante en los animales transgénicos es que una manipulación genética que tenga efecto durante toda la vida puede forzar a los animales a hacer cambios compensatorios a lo largo de su desarrollo.

En los ratones UCP/DTA se expresa un transgen de la difteria en el tejido adiposo marrón que genera la desaparición de este tejido adiposo marrón desarrollando un grado medio de obesidad y de resistencia a la insulina pero que es menos severo que los observados en los ratones *ob/ob* o *db/db* (Lowell et al., 1993).

También se han desarrollado animales que a pesar de que no desarrollan obesidad, generan daños cardiovasculares que se han visto en los animales obesos. La mayoría de estos modelos tienen elevados niveles de AGL y limitan la capacidad de la mitocondria para poder oxidarlos. También los hay en los que se han mutado la vía de señalización de la insulina (Hsueh et al., 2007).

II. TEJIDO ADIPOSEO.

II.1. Distribución y organización del tejido adiposo.

Durante muchos años se ha considerado al tejido adiposo como el mayor reservorio energético en animales superiores y en humanos. Sin embargo, el tejido adiposo también cumple una importante función como órgano endocrino ya que produce un elevado número de moléculas bioactivas, generalmente llamadas adipoquinas, que participan en la regulación del metabolismo energético. Además, el tejido adiposo interviene no solo en diversos procesos como son la regulación de la temperatura corporal, la protección mecánica y el aislamiento térmico (Ahima, 2006; Fantuzzi, 2005).

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo especializado cuyas células más características son los adipocitos. Además, también está formado por otros tipos de células, que constituyen la fracción estroma-vascular, como son las células precursoras de adipocitos o pre-adipocitos, células sanguíneas, células endoteliales, fibroblastos y células inmunitarias (Cinti, 2005).

Se pueden distinguir dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo marrón (o grasa parda) y el tejido adiposo blanco. La principal función descrita hasta el momento para la grasa parda es la de generar calor, gracias a la proteína de la membrana interna proteína desacoplante mitocondrial-1 (UCP-1) que disipa el gradiente electroquímico en forma de calor (Ravussin and Galgani, 2011). El tejido adiposo marrón aparece únicamente en mamíferos y es especialmente abundante en los recién nacidos ya que les permite mantener el calor corporal al pasar del vientre de la madre, donde la temperatura es óptima, al exterior, donde la temperatura puede variar incluso de manera extrema. Los adipocitos marrones presentan múltiples gotas lipídicas y numerosas mitocondrias circulares de gran tamaño que confieren una cierta tonalidad oscura, que es lo que da el nombre a este tejido. Con el desarrollo, el tejido adiposo marrón va desapareciendo e incluso se llegó a pensar que desaparecía por completo. Se ha descubierto, sin embargo, que en los adultos se encuentran algunos acúmulos de tejido adiposo marrón muy escasos y dispersos (Virtanen et al., 2009).

En general, cuando se habla del tejido adiposo se hace referencia al tejido adiposo blanco, que es el que está implicado en la obesidad. A diferencia de la grasa parda los adipocitos del tejido adiposo blanco presentan una única gota lipídica que ocupa la mayor parte del citoplasma. El tejido adiposo es un órgano extraordinariamente heterogéneo en cuanto a su composición y a su distribución corporal. Se diferencian dos depósitos principales de tejido adiposo: el depósito subcutáneo correspondiente al tejido adiposo que se localiza bajo la piel, y el depósito intraperitoneal, que se localiza dentro de la cavidad peritoneal donde se encuentra el tejido adiposo visceral (Marin et al., 1992). Hace tiempo que se sabe que el tejido adiposo visceral y el subcutáneo presentan numerosas diferencias anatómicas, celulares y moleculares (Montague and O'Rahilly, 2000; Wajchenberg, 2000). Por ejemplo, la irrigación de ambos tejidos es diferente y los niveles de RNA mensajero (mRNA) de leptina en el tejido adiposo subcutáneo están incrementados respecto del visceral (Montague et al., 1997). Estos tejidos también son diferentes en cuanto a la capacidad de movilización de ácidos grasos, la grasa visceral es más sensible a los efectos lipolíticos de las catecolaminas y menos sensible a los efectos antilipolíticos de la insulina; por tanto, este tejido tiene una mayor capacidad de movilización de ácidos grasos que el depósito subcutáneo (Hellmer et al., 1992).

La obesidad periférica se caracteriza por una acumulación de tejido adiposo subcutáneo y es más frecuente en mujeres. Este tipo de obesidad no se ha asociado a un

mayor riesgo de sufrir patologías asociadas. Por otro lado, la obesidad central o abdominal es más frecuente en hombres y consiste en una acumulación de tejido adiposo visceral. Este tipo de obesidad se ha asociado, mediante estudios epidemiológicos, con un mayor riesgo de sufrir enfermedades tales como resistencia a la insulina, diabetes de tipo II, hipertensión, etc. (Fox et al., 2007); sin embargo no se conoce el mecanismo molecular subyacente. No obstante, se han propuesto algunas teorías para explicar tales observaciones.

La teoría portal propone que la irrigación portal que recibe el hígado procedente del tejido adiposo visceral sería la responsable de las alteraciones metabólicas, de manera que en un estado de obesidad abdominal habría una elevada secreción de ácidos grasos y factores inflamatorios que a través de la vena porta accederían al hígado donde tienen efectos nocivos sobre su función biológica (Rytka et al., 2011). Otra teoría sugiere que los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo y visceral tienen diferentes propiedades de manera intrínseca. Se ha descrito que el patrón de expresión génica es muy diferente cuando se considera tanto el tejido total como los adipocitos y los preadipocitos de los depósitos subcutáneo y visceral de ratones y de humanos (Gesta et al., 2006), lo cual apoya la teoría que propone que ambos tejidos podrían proceder de diferentes linajes durante el desarrollo. Esta teoría se ha visto reforzada por experimentos de trasplante de tejido adiposo en ratones. Mientras que la inserción de tejido subcutáneo desde un donante a una localización visceral de un receptor tiene efectos beneficiosos sobre este último, la inserción de tejido adiposo visceral desde un donante a una localización subcutánea del receptor tiene un ligero efecto perjudicial (Tran et al., 2008).

II.2. El tejido adiposo como órgano endocrino.

El tejido adiposo no es simplemente un reservorio para el almacenamiento de energía, sino que también es capaz de expresar y secretar una gran variedad de moléculas bioactivas, conocidas como adipoquinas, que pueden actuar tanto a nivel local (autocrina/paracrina) como a nivel sistémico (endocrino) (Fruhbeck et al., 2001; Rasouli and Kern, 2008). Por todo ello, podríamos decir que el tejido adiposo aparte de ser un órgano necesario para el almacenamiento y liberación de energía, también contiene la maquinaria necesaria para permitir la comunicación con distintos órganos incluido el sistema nervioso central (SNC). Así pues, a través de una importante red

interactiva, el tejido adiposo se ve implicado en una gran variedad de procesos biológicos como el metabolismo energético y diversas funciones neuroendocrinas e inmunes (Kershaw y Flier 2004).

El número de adipoquinas que se conocen en la actualidad es superior a 50 (Ouchi et al 2011, Rosen y Spiegelman 2006), y las podemos clasificar en:

- a. Moléculas asociadas con la regulación de la ingesta y del gasto energético como la leptina, adiponectina y adiposina (Havel, 2004; Meier and Gressner, 2004).
- b. Moléculas asociadas con la sensibilidad a la insulina y el metabolismo glucídico y lipídico como la adiponectina, resistina, TNF- α , apelina y visfatina, RBP-4, ZAG, omentina, vaspina, chemerina, ANGPTL2, lipocalina 2. CXCL5, SFRP5 (Chavey et al., 2009; Tabata et al., 2009; Wada, 2008).
- c. Citoquinas relacionadas con el sistema inmune y la inflamación como el TNF- α , la familia de interleuquinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), MCP-1, la proteína C reactiva y el almidón sérico (Fantuzzi, 2005b; Trayhurn and Wood, 2004).
- d. Moléculas asociadas a la función vascular como la angiotensina, PAI-1 y el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (Karlsson et al., 1998).

Sin embargo hay que destacar que estas adipoquinas actúan de forma integral y coordinada en la regulación de los diversos procesos fisiológicos. Los principales tejidos diana donde se expresan receptores de estas adipoquinas son, además del propio tejido adiposo, el hígado, el músculo esquelético, cerebro, sistema reproductor, sistema inmune y cardiovascular.

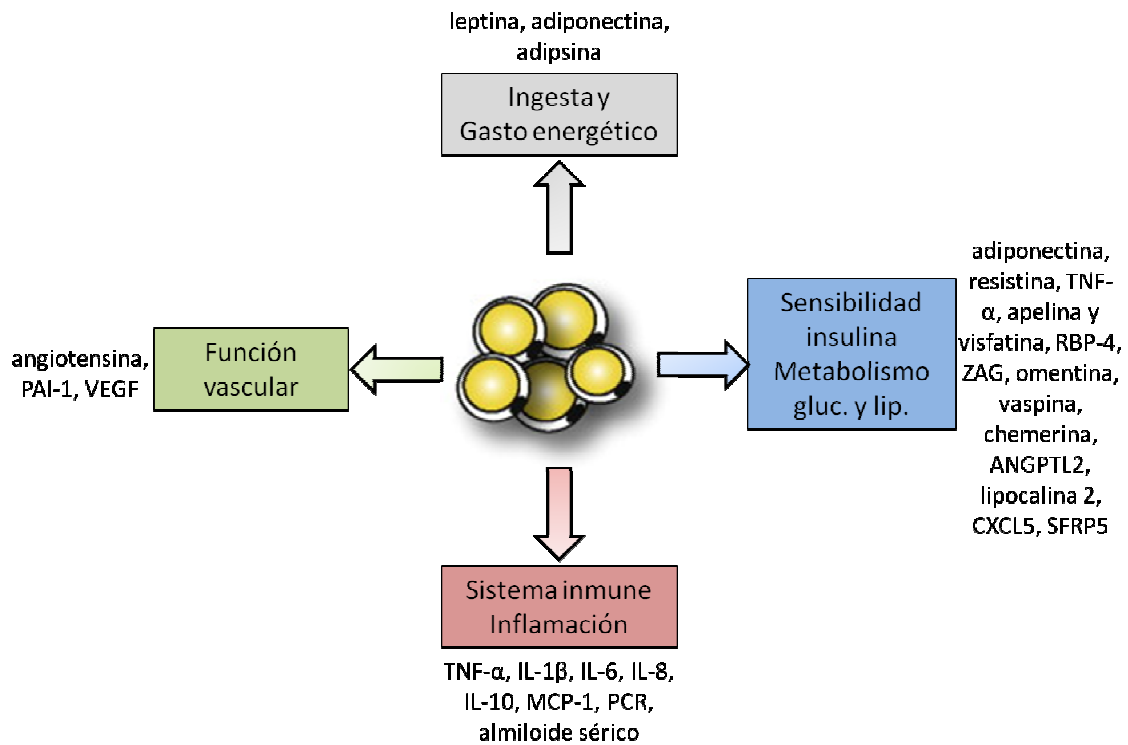


Figura 7: Esquema representativo de algunas adipoquinas secretadas por el tejido adiposo y su clasificación.

III. LEPTINA.

En 1958 los estudios de Hervey y posteriormente los de Coleman (1973) mostraron la presencia de un factor circulante capaz de regular el metabolismo energético, pero no fue hasta 1994 cuando se consiguió identificar dicho factor al que se denominó leptina (Zhang et al., 1994). Su descubrimiento supuso uno de los avances más importantes en la investigación de la fisiopatología de la obesidad.

La leptina se sintetiza en forma de un precursor de 167 aminoácidos. Los últimos 21 aminoácidos en la zona C-terminal constituyen un péptido señal, que es escindido cuando la leptina se secreta al torrente circulatorio (Zhang et al., 1994). La leptina circulante es una proteína con un peso molecular de 16 kDa con una estructura terciaria en forma de haz de cuatro hélices α , mantenida gracias a un puente disulfuro entre las cisteínas 96 y 146. La mutación de cualquiera de estas dos cisteínas da lugar a una proteína biológicamente inactiva, poniendo de manifiesto que son necesarias para la integridad y estabilidad de la proteína (Rock et al., 1996).

La secuencia de aminoácidos de la leptina exhibe muy pocas diferencias interespecies. Así, la leptina humana presenta una homología del 84% con la proteína de ratón y del 83% con la de la rata (Doyon et al., 2001). Por su disposición espacial, la leptina se clasifica dentro de la familia de citoquinas de cadena larga, a la que pertenecen la IL-6, IL-11, IL-12, el factor inhibitorio de leucemia (LIF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la oncostatina M (Zhang et al., 1994).

La síntesis de leptina se lleva a cabo principalmente en el tejido adiposo y en otros tejidos como la placenta, el estómago, el hígado o el corazón (Zeidan et al., 2011; Lollmann et al., 1997; Tartaglia et al., 1995; Ahima and Flier, 2000). Su secreción es pulsátil y presenta un ritmo circadiano, aumentando en las horas de luz en el hombre y de oscuridad en roedores. Una vez en la sangre, la leptina se encuentra en forma libre o bien unida a proteínas plasmáticas (Komardina and Tokarev, 1977). Sus niveles plasmáticos oscilan entre 1-15 ng/ml en individuos con normopeso y de 15 ng/ml en adelante en individuos obesos, llegando hasta valores superiores de 100 ng/ml. Su semivida es de 25 minutos para la forma endógena y de 90 minutos para la exógena y su eliminación es por vía renal. La secreción de leptina es regulada por diferentes factores como la edad, las dietas ricas en grasa, la insulina o los glucocorticoides que aumentan la producción de leptina, mientras que el ayuno, el ejercicio físico, el calor o la estimulación adrenérgica la inhiben (Komardina and Tokarev, 1977; Ahren et al., 1997; Szkudelski, 2007).

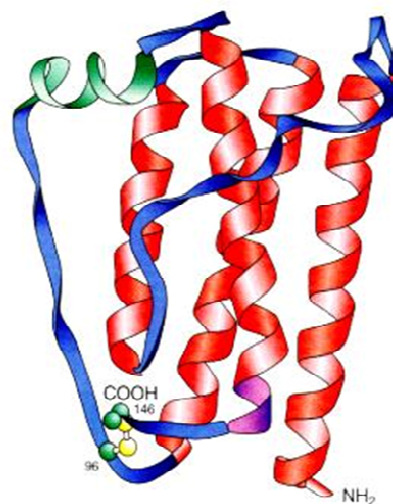


Figura 8: Estructura tridimensional de la leptina.

III.1. Receptor de leptina.

El receptor de leptina (Ob-R) fue identificado como una proteína de membrana similar a los receptores de citoquinas de clase I (Tartaglia et al., 1995). Los receptores de leptina están presentes en varios tejidos periféricos dejando claro que la leptina media una amplia variedad de efectos directos periféricos, incluyendo a los específicos del sistema cardiovascular. Se han identificado 6 isoformas del receptor (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf) que poseen un dominio extracelular común variando el tamaño de sus dominios intracelulares (Rahmouni, 2010). La isoforma Ob-Re es diferente ya que es la única que no posee un dominio transmembrana, siendo la forma más corta. Circula en sangre y tiende a unirse a la leptina libre circulante (Lammert et al., 2001) actuando como sistema tampón y regulando sus niveles plasmáticos (Lollmann et al., 1997; Chan et al., 2002). Las isoformas Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, y Ob-Rf se denominan isoformas cortas ya que poseen un dominio intracelular entre 32-40 aminoácidos (Rahmouni, 2010), mientras que la isoforma Ob-Rb posee un dominio intracelular de aproximadamente 306 aminoácidos y parece mediar la mayoría de los efectos biológicos de la leptina (Bjorbaek et al., 1997a). Un fallo en la expresión de dicha isoforma se asocia con obesidad, resistencia a la insulina y daño cardíaco (Chua, Jr. et al., 1996; Ren et al., 2008; Dixon et al., 2009).

El dominio intracelular de todas las isoformas de Ob-R, excepto Ob-Re, posee en los 29 aminoácidos próximos a la membrana una secuencia consenso “Box 1”, región altamente conservada en la mayoría de los receptores de citoquinas de clase I, que es el dominio de unión de las JAK (Janus quinasas). Tan sólo Ob-Rb contiene, además, la secuencia “Box 2”, dominio de unión del factor de transcripción STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (Bjorbaek et al., 1997b; Sweeney, 2002).

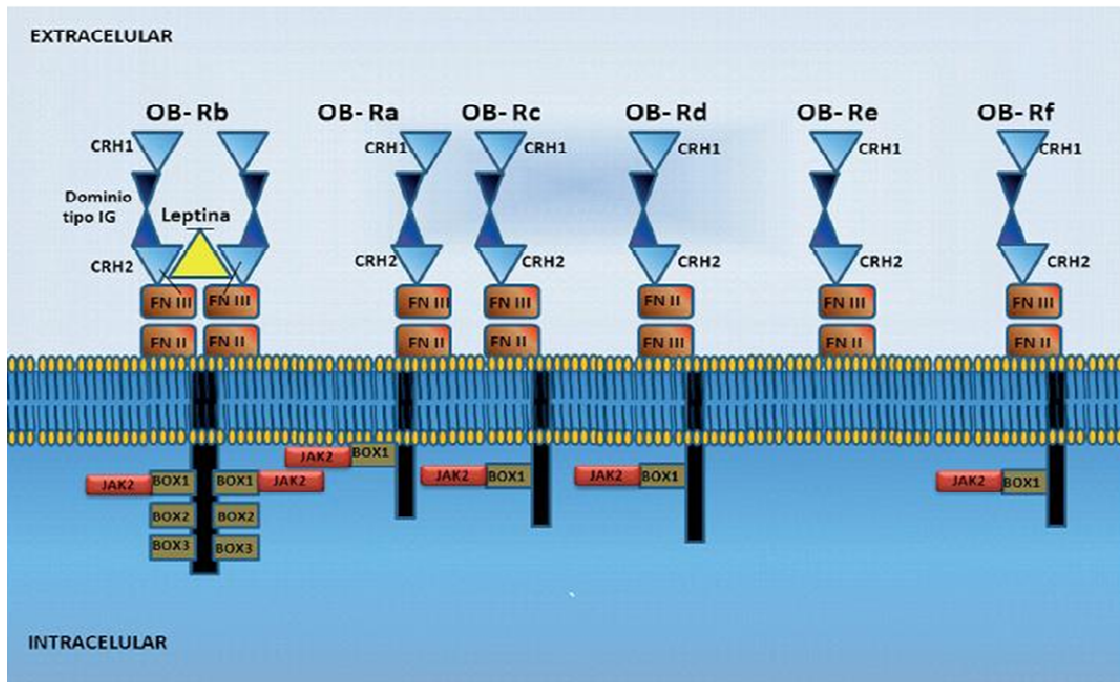


Figura 9: Isoformas del receptor de leptina.

III.2. Vías de señalización de la leptina.

La principal vía de señalización acoplada al receptor de leptina es la vía JAK-STAT. Otras vías descritas son la vía fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K) y la vía MAP-quinasa (MAPK).

III.2.1. Vía JAK/STAT.

La unión de dos moléculas de leptina a un dímero de Ob-R, provoca un cambio conformacional que permite la yuxtaposición y activación de las proteínas JAK-2 en la región BOX-1, localizada en la región intracelular. Las proteínas JAK-2, con actividad tirosinquinasa intrínseca, fosforilan el receptor de leptina en los residuos Tyr⁹⁸⁵ y Tyr¹¹³⁸ permitiendo la unión a proteínas que contienen el dominio SH₂, como la STAT (Fruhbeck, 2006). Seguidamente la STAT se fosforila en el residuo Tyr⁷⁰⁵ (pSTAT), se separa del receptor y forma un heterodímero que trasloca al núcleo, donde se une a secuencias específicas de ADN activando genes relacionados con la homeostasis energética (Vaisse et al., 1996; Brown et al., 2001).

Esta vía tiene gran importancia en la regulación del balance energético, ya que controla la expresión de neuropéptidos relacionados con la ingesta de alimentos como el péptido anorexigénico POMC y la proteína orexigénica *agoutí*.

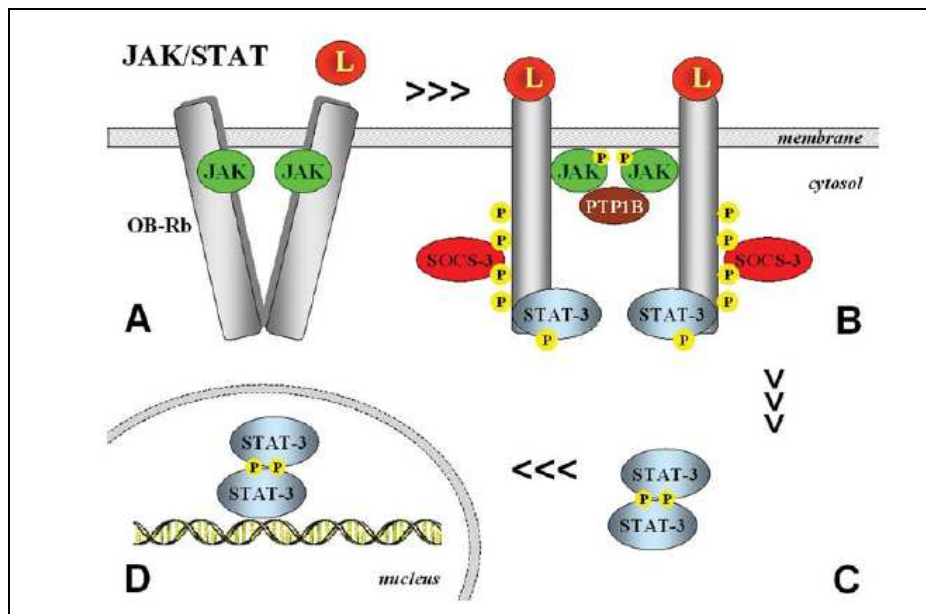


Figura 10: Señalización de leptina a través de la activación de la vía JAK/STAT-3. Imagen tomada de (Fruhbeck, 2006).

III.2.2. Vía fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K).

La vía PI3K es activada tanto por la insulina como por la leptina. De hecho, la mayoría de las acciones de la insulina son mediadas por la vía PI3K, mostrando una relación entre la insulina y la leptina. La unión de la leptina a su receptor permite la unión de otros componentes como el IRS, que es fosforilado por el receptor de leptina. Esta fosforilación genera la activación de PI3K ya que aumenta la actividad del dominio catalítico de una subunidad reguladora de PI3K como es el p85. PI3K es capaz de fosforilar y activar Akt a través de una serina/treonina quinasa, la quinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1). A través de AKT, la PI3K regula numerosas funciones fisiológicas, como la supervivencia y proliferación celular, la reorganización del citoesqueleto, la apoptosis y el metabolismo de la glucosa entre otras.

La quinasa activa Akt activa procesos fisiológicos de angiogénesis y vasodilatación; la PDE3B, que participa en cascadas relacionadas con el metabolismo glucídico y la regulación de la ingesta; y la p70S6 quinasa (p70S6K), enzima que pone en marcha señales mitogénicas en células mononucleares.

En el corazón, la activación de Akt está implicada en la regulación del crecimiento cardíaco, la contracción cardíaca y la angiogénesis (Catalucci et al., 2008).

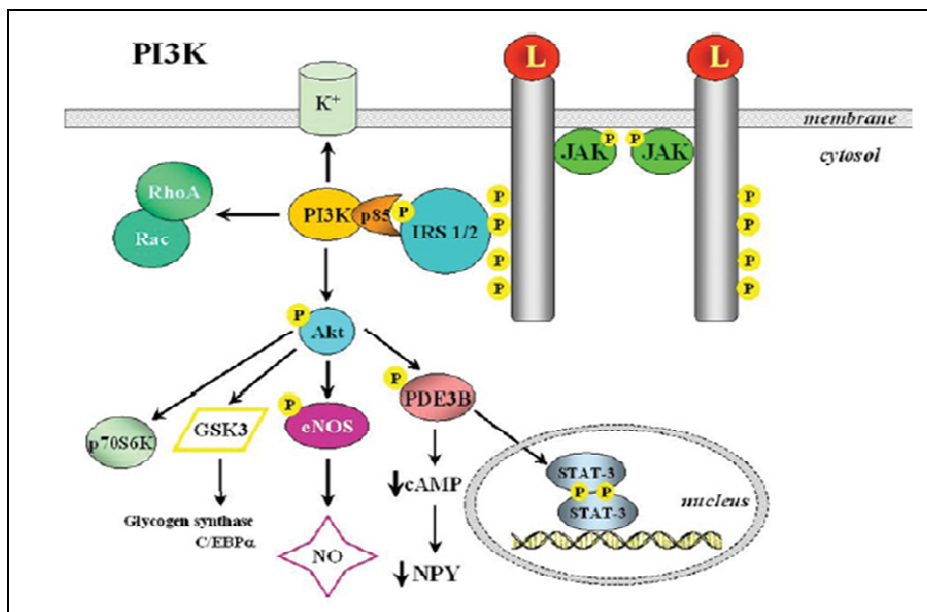


Figura 11: Señalización de leptina a través de la activación de la vía PI3K. Imagen tomada de (Fruhbeck, 2006).

III.2.3. Vía MAP-quinasa (MAPK).

Otra vía de señalización del receptor de leptina es la ruta Ras/Raf/ERK (extracelular-signal-regulated-kinase) o MAP-quinasa. La fosforilación del receptor de leptina en el residuo Tyr⁹⁸⁵ también sirve de unión para las proteínas ERK, a través de la activación del dominio SH₂ (Bjorbaek et al., 2001). Esta vía se activa con la unión de la leptina a su isoforma larga, Ob-Rb, y corta, Ob-Ra del receptor (Bjorbaek et al., 1997). Su

activación conduce a la expresión de genes relacionados con la proliferación y la diferenciación celular (Fruhbeck, 2006), además de estar implicada en los efectos hipertróficos mediados por la leptina (Zeidan et al., 2006).

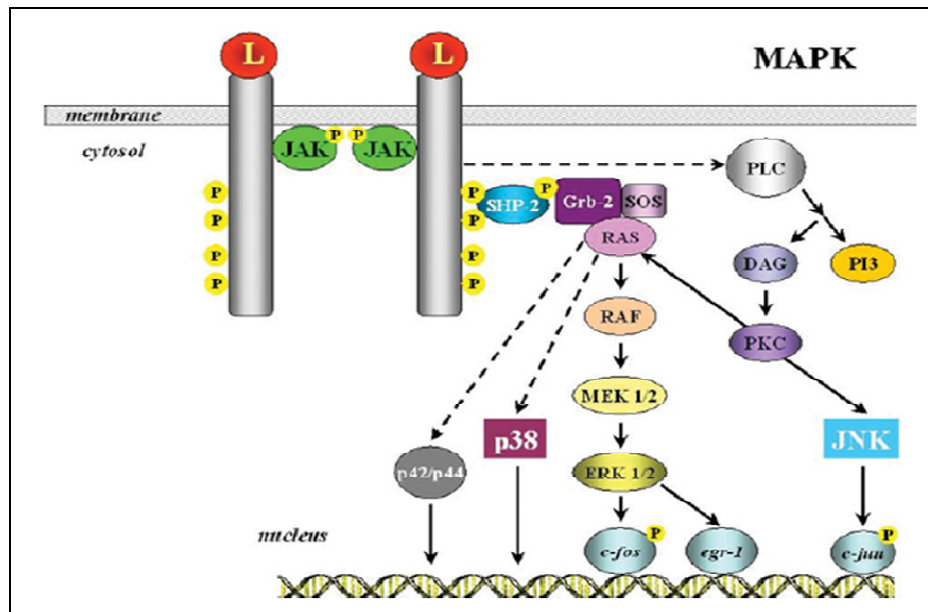


Figura 12: Señalización de leptina a través de la activación de la vía MAPK. Imagen tomada de (Fruhbeck, 2006).

III.3. Efectos de la leptina.

III.3.1. Efectos de la leptina sobre la ingesta de alimentos.

La principal función de la leptina es controlar la ingesta y el gasto energético. Estas acciones de la leptina están reguladas por su receptor Ob-Rb (Haynes et al., 1997). Una de las principales dianas de las acciones centrales de la leptina es el neuropéptido Y (NPY), el cual estimula la ingesta de alimentos e inhibe la termogénesis mientras que incrementa los niveles séricos de insulina y de esteroides (Stephens et al., 1995; Satoh et al., 1999). La leptina suprime la liberación del NPY desde el hipotálamo generando

una reducción en la ingesta de alimentos, incrementando la termogénesis y reduciendo la masa grasa total (Ahima and Flier, 2000).

La leptina tiene potentes efectos directos sobre el metabolismo lipídico permitiendo una reducción de la masa grasa (Flier, 1997). En el músculo esquelético la leptina inhibe la señalización de la insulina, generando resistencia a la insulina y reduciendo la ingesta de glucosa (Lonnqvist et al., 1995). El aumento de los niveles intracelulares de glucosamina en el exceso de oferta de nutrientes y almacenamiento de energía activan la expresión de la leptina en el músculo y en el tejido adiposo (Wang et al., 1998). En este caso, la leptina inhibe la ingesta de AGL en la mitocondria, incrementando de esta manera la oxidación de ácidos grasos y reduciendo el contenido lipídico en las células (Minokoshi et al., 2002). Esto implica un papel de la leptina en la protección de la lipotoxicidad y de la esteatosis por la inhibición de la lipogénesis y el aumento de la oxidación de ácidos grasos que contrarrestan la acción de insulina.

La mayoría de personas obesas poseen niveles circulantes elevados de leptina. A pesar de ello no existe una reducción del apetito o un incremento del gasto energético. A este fenómeno se le conoce como resistencia a la leptina. Existen varios mecanismos que podrían contribuir a la resistencia de la leptina. Las dos hipótesis que han centrado una mayor atención para explicar esta resistencia son que se produce una resistencia a la leptina a nivel del sistema nervioso central (Banks and Farrell, 2003) o que ocurre un fallo en la cascada intracelular del receptor de la leptina Ob-Rb (Munzberg and Myers, Jr., 2005). Sin embargo la influencia de la leptina no solo sobre la regulación de la ingesta, sino también sobre sus efectos en tejidos periféricos, genera el concepto de una resistencia a la leptina selectiva que ocurre en la obesidad. Este concepto propone que algunos efectos mediados por la leptina como la inhibición del apetito se encuentran disminuidos, pero otros efectos como el remodelado cardiaco, o el tono simpático permanecen intactos. En un estudio de administración de dieta rica en grasa en ratones durante 32 semanas, se generó resistencia sobre los efectos metabólicos de la leptina, pero la activación simpática mediada por la leptina en el corazón y en la vasculatura permaneció intacta (Belin de Chantemele et al., 2011).

III.3.2. Efectos cardiovasculares de la leptina.

La expresión de leptina y de las diferentes isoformas de su receptor ha sido demostrada en una amplia variedad de tipos celulares de origen cardiovascular tales como células endoteliales (Sierra-Honigmann et al., 1998), células de músculo liso (Schafer et al., 2004), cardiomiocitos y cardiofibroblastos (Rajapurohitam et al., 2003a; Barouch et al., 2003). Son muchos los estudios que han mostrado las correlaciones encontradas entre los niveles circulantes de leptina y eventos cardiovasculares (Koh et al., 2008). En general, en la mayoría de los individuos obesos hay niveles elevados de leptina y por ello prevalece la hipótesis de que estos niveles elevados de leptina se correlacionan con resistencia a la acción de la leptina (Martin et al., 2008; Enriori et al., 2006).

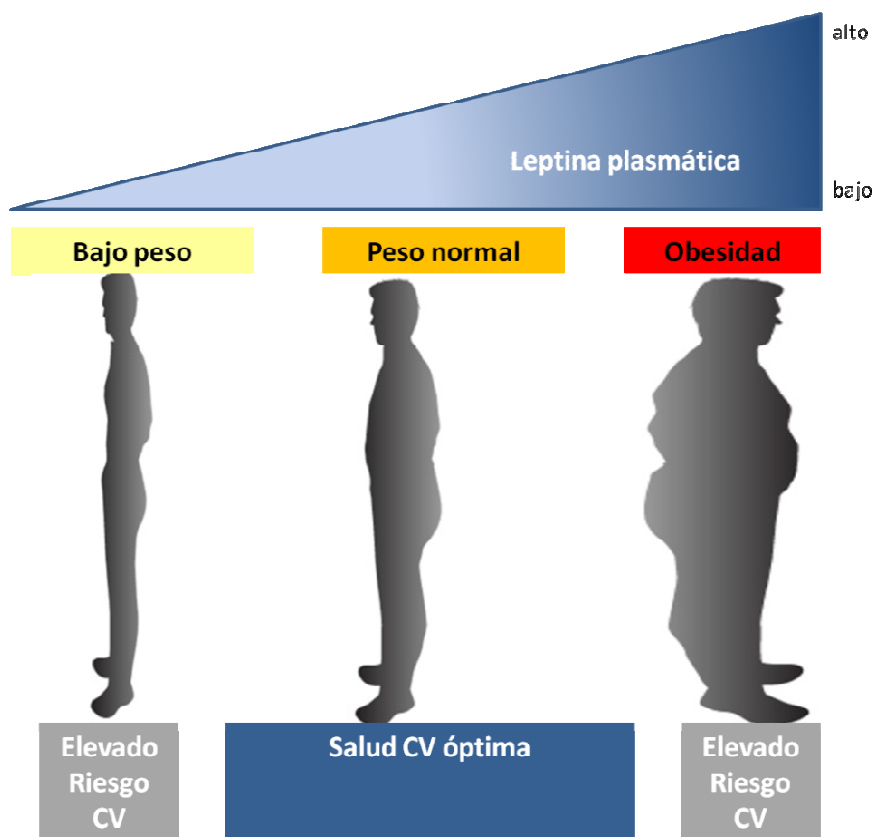


Figura 13: Los niveles plasmáticos de leptina aumentan con el grado de obesidad. Tanto la hiperleptinemia como la obesidad se asocian con un elevado riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Adaptación de (Abel and Sweeney, 2012).

a) Efectos cardiacos de la leptina.

Efectos metabólicos: En el corazón de individuos obesos es típico encontrar una disminución en los ratios de oxidación de la glucosa y un incremento en los de oxidación de ácidos grasos (Lopaschuk et al., 2007). Estas alteraciones en el metabolismo cardiaco son una de las primeras alteraciones en aparecer y es fundamental para la consiguiente disfunción contráctil. En corazones aislados de rata, la leptina ha mostrado que incrementa la oxidación de los ácidos grasos, y este efecto se acompaña de un incremento en el consumo de oxígeno disminuyendo la eficacia cardiaca (Atkinson et al., 2002). Este incremento en la oxidación de ácidos grasos generado por la leptina es vía STAT-3, NO y MAPK (Sharma et al., 2009).

En cardiomiocitos, la leptina ha mostrado también el incremento en el consumo de ácidos grasos a tiempos cortos y una acumulación de lípidos intracelulares a tiempos más largos (Palanivel et al., 2006).

Por otro lado, la leptina no ha mostrado ningún efecto directo sobre el consumo de glucosa en cardiomiocitos, ni sobre la oxidación de glucosa en corazones aislados de rata.

Efectos apoptóticos: La apoptosis de cardiomiocitos tiene un papel importante en el desarrollo de insuficiencia cardiaca, particularmente en la transición de un remodelado compensatorio o a un remodelado que va a generar dicha insuficiencia. La leptina protege a los cardiomiocitos de la apoptosis inducida por condiciones de hipoxia-reoxigenación o por estrés oxidativo (Shin et al., 2009; Eguchi et al., 2008). En este efecto protector de la leptina, se requiere la vía de señalización de la leptina PI3K. La administración de leptina ha demostrado reducir el área del infarto en modelos de isquemia-reperfusión (Smith et al., 2006). Este efecto de la leptina, se asemeja a la llamada paradoja de la obesidad donde pacientes que han sufrido un infarto de miocardio y que tienen un mayor IMC evolucionan mejor que otros con características similares pero con peso bajo o normal.

Efectos hipertróficos: El fallo cardiaco se asocia con hipertrofia del ventrículo izquierdo. Inicialmente, esta hipertrofia representa un mecanismo adaptativo favorable, pero finalmente se traduce en un proceso perjudicial que acelera la disfunción cardiaca. La leptina, de manera directa, genera hipertrofia en cardiomiocitos tanto de humanos

como de roedores (Madani et al., 2006a; Rajapurohitam et al., 2003). La leptina media sus efectos hipertróficos, al menos en parte, a través de la vía MAPK, que es característica en corazones con hipertrofia (Zeidan et al., 2006; Dorn and Force, 2005). En este sentido existen trabajos contradictorios en los que han visto como la infusión de leptina en ratones *ob/ob* disminuye el grosor de la pared ventricular generado tras la ligadura de la arteria coronaria (McGaffin et al., 2008).

Efectos sobre la matriz extracelular: Las alteraciones en la matriz extracelular cardiaca contribuyen a cambios en el tamaño, en la estructura y en la función del corazón. Existen pocos estudios que muestren que la leptina puede influir en el remodelado cardiaco. En miocitos ventriculares humanos, la leptina incrementó los niveles de ARNm de procolágeno tipo III y IV, y disminuye los niveles de procolágeno tipo I, aunque no generó cambios en la síntesis total de colágeno (Madani et al., 2006). La estimulación con leptina en fibroblastos de ratas neonatales, los niveles de procolágeno tipo I secretados e intracelulares están incrementados, mientras que los niveles de procolágeno tipo III están disminuidos (Schram et al., 2008).

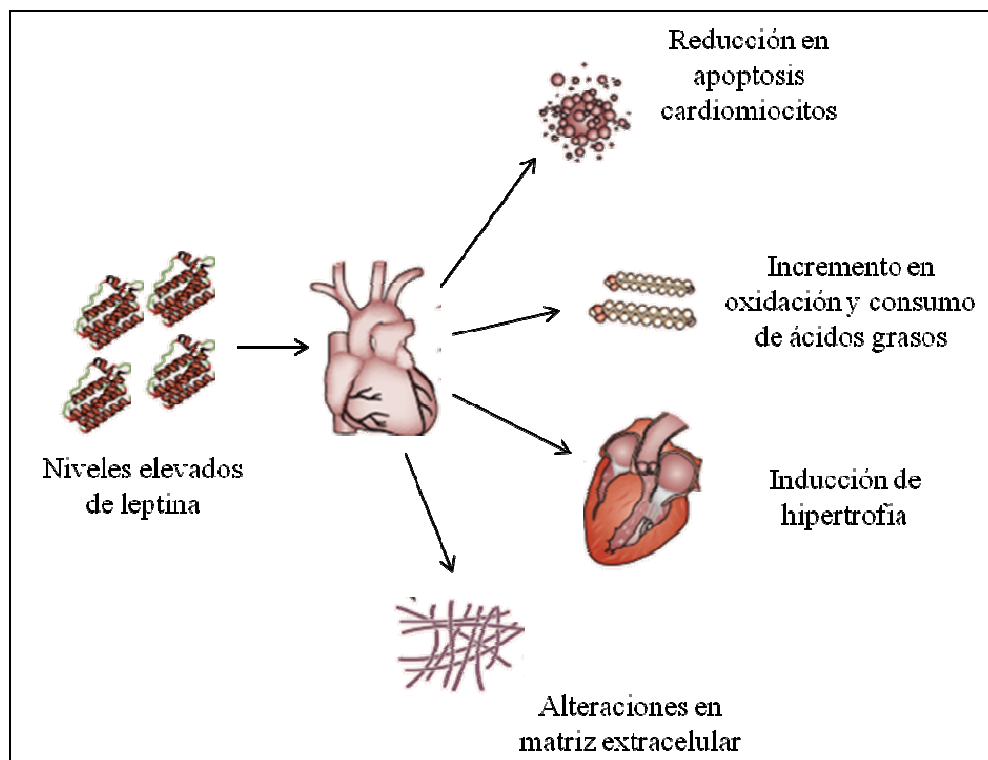


Figura 14: Efectos directos de la leptina en el corazón. Adaptación de (Sweeney, 2010).

b) Efectos vasculares de la leptina.

Efectos hipertensivos: Como ya se ha explicado previamente, la obesidad se asocia con un elevado riesgo de padecer hipertensión. En individuos obesos con hipertensión existen claras correlaciones entre la presión sanguínea y los niveles circulantes de leptina (Haynes, 2005). Estas asociaciones encontradas son independientes de distintos factores que pueden influir sobre los niveles de presión sanguínea como puede ser la edad, el sexo o la etnia de los individuos estudiados. Una posible razón para estas observaciones es que la resistencia a la leptina en la obesidad es selectiva a la regulación a nivel de hipotálamo a la ingesta de alimentos, pero no a la capacidad de la leptina a estimular la activación simpática central. Los resultados periféricos posteriores incluyen un aumento en el efecto sistémico presor y una disminución de la natriuresis renal riñón, mecanismos que contribuyen a la hipertensión (Rahmouni et al., 2005). Esta teoría se confirma en un estudio que muestra como la sobreexpresión de leptina genera hipertensión en ratones, efecto que se revierte mediante el tratamiento con un antagonista de la leptina (Rahmouni et al., 2005).

Efectos ateroscleróticos: La leptina aumenta y acelera la aterosclerosis mediante distintos mecanismos que incluyen la estimulación del reclutamiento en la íntima de monocitos, la transformación de macrófagos a células espumosas, la proliferación de células de músculo liso y también la secreción de citoquinas proaterogénicas (Beltowski, 2006). Asimismo, la administración de leptina en ratones ApoE^{-/-} incrementa la aterosclerosis. También se ha observado, un aumento en el receptor de leptina ObR en lesiones ateroscleróticas. Un estudio en monocitos humanos, ha demostrado que la leptina ejerce sus efectos proaterogénicos a través de la vía PI3K y mediante el incremento del estrés oxidativo generado por la leptina (Konstantinidis et al., 2009).

Mediación de la disfunción endotelial: Tanto a través de los efectos mencionados anteriormente de la leptina a nivel vascular como mediante efectos directos, dicha adipocina es capaz de mediar la disfunción endotelial. Estos efectos directos de la leptina son mediados a través de la activación de la MAP quinasa, y también a través de la activación de PI3K (Procopio et al., 2009). En vasos de ratas controles, la leptina genera relajación mediada por óxido nítrico dependiente de endotelio, efecto que no se ve en ratas obesas Zucker (Knudson et al., 2005).

Efectos trombóticos: La formación de trombos es una de las principales causas de eventos coronarios sufridos por individuos obesos. Muchos estudios han mostrado que la leptina incrementa la agregación plaquetaria aunque este efecto es dependiente de la concentración, ya que solo altas dosis de leptina (como las encontradas en individuos obesos) son las que poseen este efecto (Nakata et al., 1999). De hecho, las plaquetas de los pacientes obesos son sensibles leptina y tienen una mayor agregación inducida por ADP, en comparación con las plaquetas de pacientes delgados (Dellas et al., 2008). Estudios animales también han demostrado el papel de la leptina en la formación de trombos. Cuando se administra leptina en ratones *ob/ob* se genera un aumento en la formación de trombos (Konstantinides et al., 2001; Bodary et al., 2002).

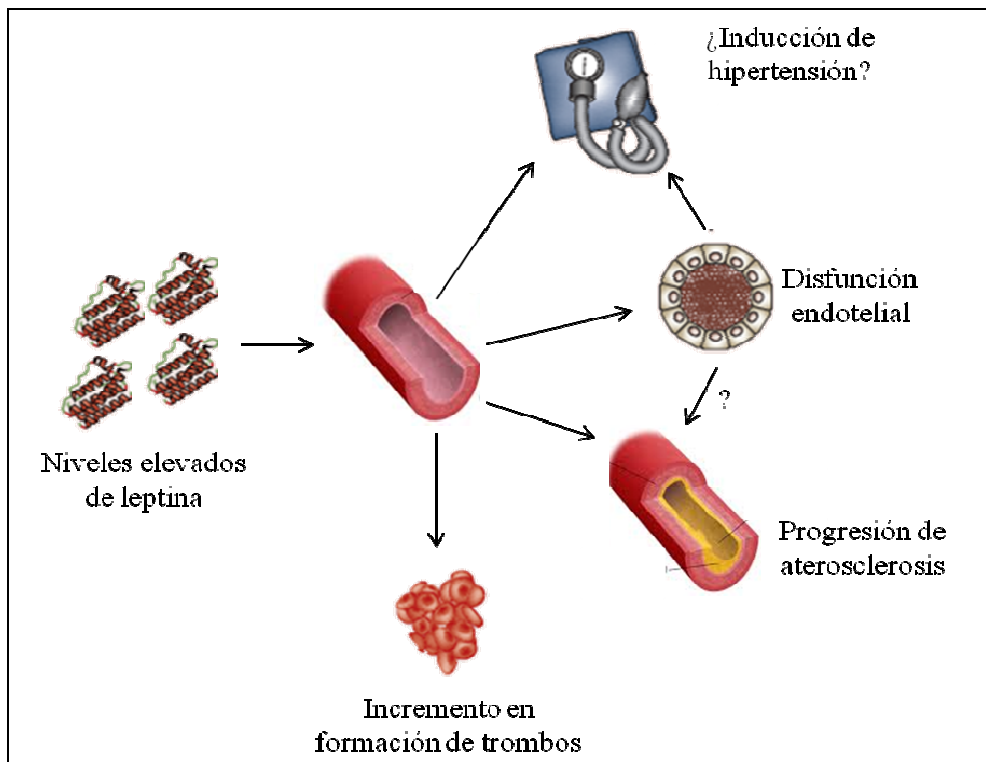


Figura 15: Efectos directos de la leptina en vaso. Adaptación de (Sweeney, 2010).

Hipótesis y objetivos

I. HIPÓTESIS.

La elevación de los niveles de leptina, tanto circulantes como producidos localmente en el sistema cardiovascular, podría participar en el daño cardiovascular asociado a obesidad.

BASES DE LA HIPÓTESIS.

1. La obesidad se asocia a cambios en la estructura y en la función cardíaca caracterizados por modificaciones en el patrón geométrico ventricular, disfunción diastólica y, eventualmente, disfunción sistólica. Estas alteraciones pueden desencadenar insuficiencia cardíaca.

2. La obesidad se asocia a cambios en la estructura vascular, caracterizados por un aumento en la rigidez de la pared arterial, que pueden determinar cambios en la función vascular.

3. En la obesidad existe un incremento de tejido adiposo en el sistema cardiovascular.

4. Las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo ejercen diferentes acciones sobre el sistema cardiovascular.

5. Los incrementos en la secreción de distintas adipoquinas como la leptina, puede jugar un papel importante en las alteraciones cardiovasculares asociadas a la obesidad.

II. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo fue valorar la posible implicación de la leptina en el daño cardiovascular asociado a la obesidad.

Los objetivos concretos del presente trabajo fueron los siguientes:

7. Caracterizar el patrón geométrico ventricular y la función cardíaca en individuos con obesidad mórbida.

8. Determinar el patrón de expresión de adipoquinas, marcadores circulantes de inflamación y estrés oxidativo en individuos con obesidad mórbida

9. Valorar el posible papel del cambio en la expresión de distintas adipoquinas (especialmente la leptina), marcadores circulantes de inflamación y estrés oxidativo en las modificaciones anatomofuncionales del corazón de individuos con obesidad mórbida.

10. Estudiar el efecto del incremento del peso corporal sobre la estructura y la función cardíaca en un modelo de obesidad inducido por dieta.

11. Estudiar el efecto del incremento del peso corporal sobre la estructura y la función vascular en un modelo de obesidad inducido por dieta.

12. Valorar el papel de la leptina en los cambios anatomofuncionales del sistema cardiovascular en un modelo de obesidad inducido por dieta. Asimismo, valorar los posibles mecanismos implicados.

*Hypothesis
and objectives*

I. HYPOTHESIS

Circulating and local leptin level increases produced at cardiovascular system levels can participate in obesity-related cardiovascular damage.

HYPOTHESIS FOUNDATION

1. Obesity is related to changes in cardiac structure and function characterized by changes in ventricular geometric pattern, diastolic and subsequent systolic dysfunction. These dysfunctions may lead to heart failure.

2. Obesity is related to changes in vascular structure and function characterized by increased arterial stiffness which may cause changes in vascular function.

3. Obesity leads to increases in the quantity of cardiovascular adipose tissue.

4. Adipokines secreted by adipose tissue have various effects on the cardiovascular system.

5. Increases in the secretion of various adipokines such as leptin may play an important role in obesity-related cardiovascular alterations.

II. OBJECTIVES.

The general objectives of the study are to assess possible leptin involvement in obesity-related cardiocascular damage.

The specific objectives are as follow:

13. Characterize ventricular geometric pattern and cardiac function in morbidly obese individuals.

14. Determine adipokine expression pattern, circulating inflammation markers and oxidative stress in morbidly obese individuals.

15. Assess the possible role of various adipokine expression changes (especially those of leptin), circulating inflammation markers and oxidative stress in anatomic-functional changes of the heart in morbidly obese individuals.

16. Study the effect of body mass increase on cardiac structure and function in a model of diet-induced obesity.

17. Study the effect of body mass increase on vascular structure and function in a model of diet-induced obesity.

18. Assess the role of leptin in cardiovascular anatomic-functional changes in a model of diet-induced obesity, and likewise assess those mechanisms involved.

Material y métodos

I. ESTUDIO EN PACIENTES.

I.1 Grupo de pacientes.

El grupo de pacientes incluyó a todos los pacientes referidos para cirugía bariátrica en el Hospital de Fuenlabrada de la Comunidad de Madrid (n=133) y a un grupo de voluntarios (n=66) de las mismas características pero con valores de IMC de peso normales. La selección de candidatos se realizó a través de un comité que incluía diversos servicios como endocrinología, cirugía general y del aparato digestivo, medicina interna y cardiología. Los criterios de inclusión fueron edad ≥ 18 años y las indicaciones universalmente aceptadas: obesidad de larga evolución (más de 4 años); índice de masa corporal (IMC) $\geq 40 \text{ kg/m}^2$ en presencia de comorbilidades relacionadas con la obesidad (diabetes mellitus, síndrome de hipoventilación-obesidad, síndrome de apnea obstructiva del sueño, hipertensión arterial). Los criterios de exclusión fueron edad > 60 años o riesgo quirúrgico inaceptable por comorbilidades concomitantes.

Tras la aceptación por parte del comité, se realizó a los pacientes un estudio cardiovascular que incluía exploración física; electrocardiograma de 12 derivaciones y ecocardiograma transtorácico. El estudio incluyó también medidas antropométricas y análisis de sangre. El protocolo fue aprobado por el comité ético y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

I.2 Mediciones antropométricas.

La talla y el peso del paciente se recogieron en el momento del ecocardiograma, vistiendo una ropa ligera y sin calzado. Para el peso se empleó una báscula de pared. Después de 10 minutos de reposo en sedestación, se adquirió el electrocardiograma de 12 derivaciones y se midió la presión arterial en el brazo no dominante. El IMC se calculó según la fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kilos)}}{\text{talla}^2 \text{ (metros)}}$$

Se clasificó a los sujetos incluidos en el estudio en función del IMC: peso normal, IMC < 25 ; sobrepeso, IMC $25 \leq < 27$; obesidad leve, IMC $27 \leq < 30$; obesidad de grado I o

moderada, IMC 30-<35; obesidad de grado II o grave, IMC 35-<40; obesidad de grado III o mórbida, IMC 40-<50; superobesidad, IMC 50-<60; y supersuperobesidad, IMC \geq 60.

I.3 Ecocardiografía

Los estudios de ecocardiografía se realizaron utilizando un equipo comercialmente disponible, Vivid® (GE Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.) equipado con una sonda de 2,5 MHz. El estudio ecocardiográfico transtorácico se realizó según las recomendaciones de la European Society of Echocardiography (Lang et al., 2006). Se calculó la masa del VI en gramos, según la fórmula de Devereaux et al (Devereux et al., 1986):

$$\text{Masa de VI} = 0,8 \times \{1,04 \times (\text{DTDVI} + \text{SIVd} + \text{PPd})^3 - \text{DTDVI}^3\} \times 0,6 \text{ g}$$

Donde DTDVI es el diámetro telediastólico del VI.

La masa del VI en los sujetos obesos se indexó a la potencia de 2,7 para minimizar la interferencia de la obesidad en la estimación de la masa ventricular (de et al., 1992), sin embargo, se indexó por superficie corporal en los sujetos controles, siendo el punto de corte para la masa indexada en el caso de los sujetos controles de 106 g/m². El grosor parietal relativo (GPR) se calculó mediante la fórmula:

$$\text{GPR} = (\text{SIVd} + \text{PPd}) / \text{DTDVI}$$

En función del GPR y de la masa indexada del VI, se definieron cuatro patrones de geometría del VI (Figura 16):

1. Normal: GPR < 0,45 y masa indexada del VI < 51 g/m^{2,7}.
2. Remodelado concéntrico: GPR \geq 0,45 y masa indexada del VI < 51 g/m^{2,7}.
3. Hipertrofia concéntrica: GPR \geq 0,45 y masa indexada del VI \geq 51 g/m^{2,7}.
4. Hipertrofia excéntrica: GPR < 0,45 y masa indexada del VI \geq 51 g/m^{2,7}.

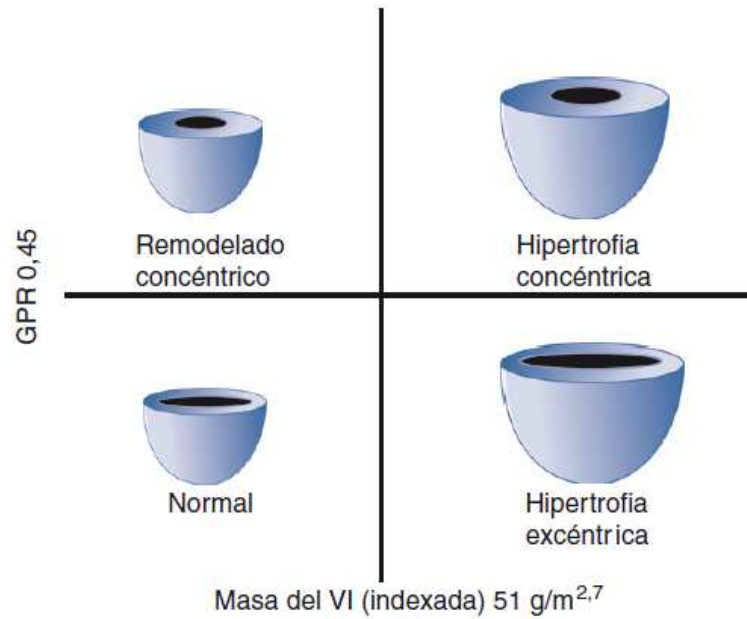


Figura 16. Patrones geométricos del ventrículo izquierdo. GPR: grosor parietal relativo. VI: ventrículo izquierdo.

Se calculó el índice de rendimiento miocárdico según fórmulas validadas (Lang et al., 2006). Se realizó el análisis mediante Doppler según las recomendaciones estándar (Lang et al., 2006). Para cada valor, se calculó el promedio de las mediciones en tres ciclos cardiacos consecutivos. La valoración de las medidas ecocardiográficas se realizó por un solo observador de manera enmascarada. Todas las mediciones se realizaron en una estación de trabajo de procesado EchoPAC® (GE Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.).

I.4 Pruebas de laboratorio.

Las muestras de sangre se obtuvieron siguiendo el protocolo clínico aprobado para la cirugía bariátrica, tras la identificación de los tubos de recogida con los datos del paciente, la propia identificación del paciente, en condiciones de ayuno y mediante colocación del paciente en decúbito supino y con el brazo en hiperextensión.

I.5 Parámetros circulantes.

Las concentraciones en suero de los analitos estudiados se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Milliplex[®] Map Kit, MA, USA).

Mediante el empleo de estos kits se estudió el perfil glucídico midiendo la concentración sérica de glucosa e insulina. La sensibilidad periférica a la insulina se evaluó basándose en el modelo de homeostasis (HOMA), calculado como el producto de las concentraciones de insulina (mU/mL) y el nivel de glucosa (mmol/L) en ayunas, dividido por 22,5.

Mediante el empleo de estos kits se estudió el perfil lipídico midiendo la concentración sérica de colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos.

Asimismo se valoró la concentración sérica de leptina, GLP-1, MMP-9, factores de daño oxidativo en el corazón como la MPO, mediadores de inflamación como PCR, PAI-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α y MCP-1 y también parámetros de detección de insuficiencia cardíaca como son los niveles de NTproBNP.

II. ESTUDIO EX VIVO.

II.1 Modelo experimental.

II.1.1. Animales.

El modelo animal utilizado fueron ratas macho Wistar de 150 g de peso aproximadamente (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Todas las manipulaciones de los animales fueron aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense de Madrid, siguiendo las guías éticas de cuidado de animales de experimentación de la Comunidad Europea. Los animales llegaron al animalario con 150 g de peso aproximadamente y fueron cuidadosamente identificados según la procedencia del animal y el nombre del investigador. El recinto donde se acondicionó a los animales se mantuvo en condiciones constantes de temperatura (20-22°C) y de humedad (50-60%), con renovaciones de aire cada hora, ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y con acceso libre al agua y al alimento.

Se emplearon 2 grupos distintos de ratas:

1.- Grupo control alimentado con una dieta estándar (CT, n=7) durante 6 semanas (3.5% grasa; Harlan Teklad #TD.2014, MN, USA).

2.- Grupo alimentado con una dieta rica en grasa (OB, n=7) durante 6 semanas (33.5% grasa; Harlan Teklad #TD.03307, MN, USA).

Los animales se pesaron una vez por semana para controlar el crecimiento de los mismos. Asimismo, la ingesta tanto de agua como de comida fue controlada a través de todo el período experimental.

La presión arterial sistólica (PAS) se midió semanalmente de manera indirecta en la arteria caudal de la cola de las ratas mediante un método pletismográfico (Narco Bio-Systems, Houston, TX, USA). Días antes de comenzar el experimento se acostumbró diariamente a las ratas al proceso de medida de la presión que consistía en mantener las ratas en una habitación con una temperatura mantenida de 28°C durante 2 horas, transcurrido ese tiempo se les medía la PAS. Una vez que los animales se

acostumbraron al proceso de medida, se determinó la PAS siendo ésta la media aritmética de ocho medidas sucesivas en dos días consecutivos y a la misma hora.

II.1.2. Estudio de la estructura y la función cardíaca.

Para el estudio tanto de la función como de la estructura cardíaca, los animales se anestesiaron con isoflurano (2%) y se les practicó una ecocardiografía transtorácica con un Acuson Sequoia 256 (Siemens Medical Solutions, Germany) conectado a un transductor lineal a 15-MHz. Grabaciones en modo M bidimensionales, fueron realizadas desde la vista del eje corto para medir las dimensiones de la cámara ventricular izquierda, el septum interventricular y la pared posterior. Las áreas del ventrículo izquierdo diastólica y sistólica fueron medidas desde el plano de eje largo paraesternal. La media de las medidas de varios latidos consecutivos se utilizó para el análisis de los datos. Los volúmenes de la cámara del ventrículo izquierdo se calcularon utilizando el modelo cilíndrico. Este modelo asume que el ventrículo se aproxima a un cilindro. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo se calculó de acuerdo con la formula Teicholz Formula:

$$FE = (EDD^3 \times 7) / (2.4 + EDD)$$

La función sistólica de la cámara del ventrículo izquierdo (función de bomba) se determinó a partir del endocárdico fraccional del ventrículo izquierdo:

$$(FS) = (LVEDD - LVESD) / LVEDD \times 100.$$

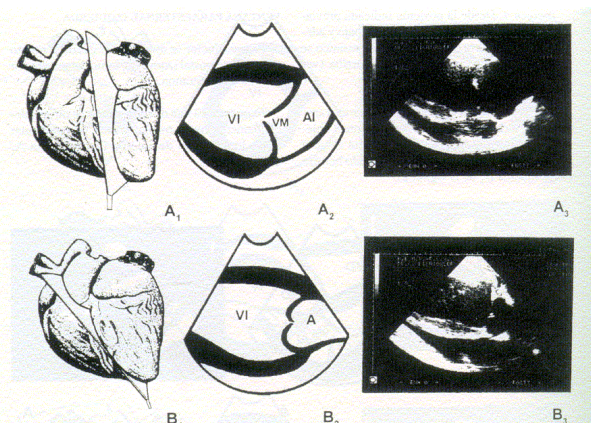


Figura 17. Imagen en eje largo representativa obtenidas desde la ventana paraesternal.

II.1.3. Sacrificio de los animales.

Previa anestesia con una mezcla de ketamina (Imalgene 1000) 70mg/kg y xilacina (Rompun 2%) 6mg/kg, los animales se sacrificaron por decapitación mediante el empleo de una guillotina. El efecto de la anestesia se evaluó mediante métodos veterinarios estandarizados que incluyen la ausencia de reflejos musculares (retirada de la pata después de un pellizco en los dedos del pie), pérdida del tono de la mandíbula y de los reflejos oculares y el cambio en el tamaño de la pupila. Una vez sacrificados los animales se procedió a la extracción de todas las muestras.

La sangre se recogió en tubos heparinizados. El plasma se separó tras centrifugar los tubos a una velocidad de 3000 rpm durante 15 minutos y a una temperatura de 4°C. Posteriormente se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Las muestras de corazón y aorta para biología molecular se extrajeron en condiciones estériles, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Las muestras de corazón y aorta utilizadas en los estudios histológicos parte se recogieron y almacenaron en formaldehído al 35% (v/v) y otra parte se introdujeron en una solución al 30% (p/v) de sacarosa y se incluyeron en medio de congelación de tejido (OTC), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

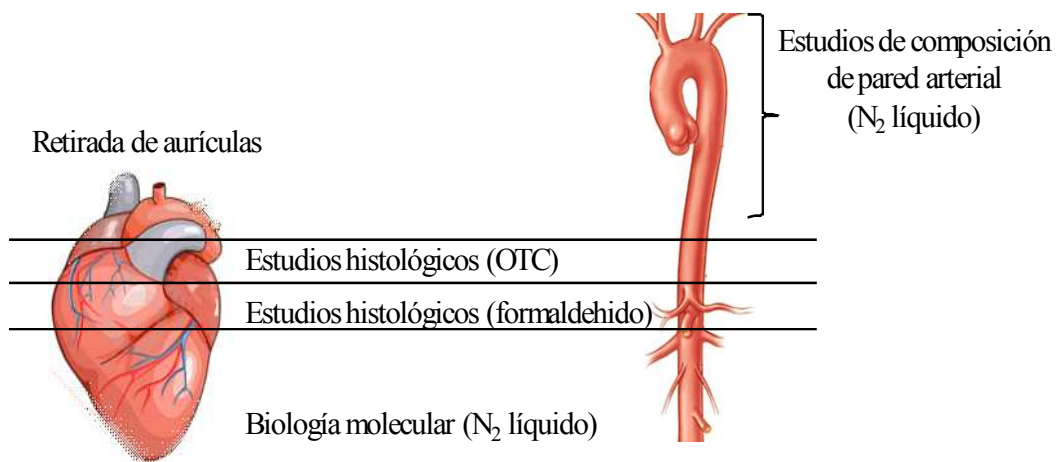


Figura 18. Imagen representativa de muestras de corazón y aorta empleadas para su posterior análisis mediante distintas técnicas.

II.2. Función vascular.

Al final del tratamiento y tras sacrificar al animal, la aorta torácica se disecó, se extrajo y se sumergió en una solución bicarbonatada de Krebs oxigenada y fría que tenía la siguiente composición en mmol/L: NaCl 118.5, KCl 4.7, CaCl₂ 2.8, KH₂PO₄ 1.1, NaHCO₃ 25.0 y glucosa 11.1. La grasa y el tejido conjuntivo adherido a la adventicia se eliminaron cuidadosamente. Posteriormente, la arteria se seccionó transversalmente en segmentos de aproximadamente 3 mm de longitud. Los anillos aórticos se colocaron en baños de órganos que contenían 5 mL de Krebs a una temperatura de 37°C y se montaron entre dos alambres rígidos de acero (150 µm de diámetro) que se introducían por la luz arterial con cuidado de no producir estiramientos en el vaso ni dañar el endotelio. Uno de los alambres permanecía fijo a la pared del baño y el otro, paralelo al anterior, se conectó a un transductor de fuerza (modelo FT03, Grass) que se encontraba acoplado a un sistema computerizado (Mc Lab 8E, AD Instruments) con el objeto de registrar los cambios desarrollados en la tensión isométrica. El medio de incubación estaba continuamente oxigenado con una mezcla gaseosa de 95% de O₂ y 5% de CO₂ que proporcionaba un pH final fisiológico entre 7,4 y 7,6.

Los segmentos arteriales se equilibraron a una tensión inicial de 2 g, reajustándolos a esta tensión y cambiando el medio de incubación con una frecuencia de 15 minutos, hasta que transcurrido un periodo de 60-90 minutos los anillos se estabilizaron a dicha tensión basal. En estudios previos se comprobó que la tensión basal de 2 g era la óptima para la expresión de la contracción inducida por cloruro potásico (KCl) en anillos de aorta de rata. La presencia de un endotelio funcional se comprobó al final de cada experimento valorando la vasorelajación inducida por 10⁻⁵ mol/L de acetilcolina (Ach). Todos los anillos que no presentaban respuesta vasodilatadora a Ach fueron eliminados.

Se estudió también la vasoconstricción dependiente de receptor en respuesta a un agonista de los receptores α₁-adrenérgicos como es la fenilefrina (FE; 10⁻⁹-10⁻⁵ mmol/L) en anillos aórticos con endotelio.

Los anillos con endotelio se contrajeron previamente con fenilefrina (FE; 5x10⁻⁷-5x10⁻⁶ mol/L) hasta alcanzar una contracción submáxima (entre el 60-70 % de la respuesta máxima) y estable, necesaria para realizar las curvas de concentración

respuesta a factores vasodilatadores independientes de endotelio como el Nitroprusiato Sódico (NPS; $10 \cdot 10^{-7}$ mol/L), donador de NO.

II.3. Procesamiento de las muestras de tejido para su análisis.

II.3.1. Extracción de proteínas.

Tanto el corazón como la aorta de cada animal se pulverizaron y se homogeneizaron con 300 μ l de buffer de lisis (Anexo a) por cada 100 μ g de tejido utilizando el homogeneizador Ultraturax. El homogeneizado se incubó durante 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 12 minutos a 4°C. Tras dicha centrifugación, se descartó el sedimento y la proteína disuelta en el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta el proceso de cuantificación de la proteína mediante la utilización del colorante, el azul de Coomassie, que reacciona con los grupos amino proteicos dando lugar a un complejo coloreado que presenta un máximo de absorbancia a 595 nm. La formación de dicho complejo es muy rápida y permanece estable durante, al menos, 60 minutos.

Para la curva patrón se prepararon soluciones de concentraciones conocidas de BSA a partir de una solución madre de 2 mg/ml mediante diluciones seriadas de $\frac{1}{2}$ en agua MiliQ. El cálculo del contenido proteico se llevó a cabo por interpolación en la curva patrón obtenida de albúmina.

II.3.2. Extracción del ARN mensajero.

La aorta abdominal de cada animal se homogeneizó en 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido fresco utilizando el homogeneizador Ultraturax. El homogenizado se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió un volumen de cloroformo equivalente a $\frac{1}{5}$ del volumen de Trizol inicialmente utilizado y se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Como resultado de la centrifugación se separaron dos fases, tomando la fase acuosa para la extracción del ARN.

A las muestras en Trizol, se les añadió un volumen de isopropanol correspondiente a la mitad del volumen de Trizol inicialmente utilizado, se mezcló, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Descartado el sobrenadante, el sedimento se lavó con un volumen de etanol al 75% igual al de Trizol inicial, se agitó vigorosamente en un vórtex y se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en 100 µl de agua tratada con dietilpicrocarbonato al 0.2% (DEPC, Sigma), para purificarlo con un kit RNAsay (Qiagen). Se mezcló un volumen de muestra con 3 volúmenes de la solución RLT del kit (que contiene tiocianato de guanidina que inactiva a las RNAsas) y 2 volúmenes de etanol. Esta mezcla se aplicó sobre la columna y se centrifugó 15 segundos a 8000 g. Después se lavó y a continuación se eluyó el ARN con agua DEPC.

La concentración de ARN se estimó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. Como una unidad de absorbancia (UA) corresponde aproximadamente a 40 µg/ml de ARN, la concentración se calculó a partir del valor obtenido a 260 nm. Asimismo, el ratio 260/280 nm que determina la relación ARN/proteína, debe ser cercano a 2 para que la pureza del ARN pueda ser considerada aceptable.

II.4. Determinaciones histológicas.

Muestras de tejido se fijaron durante 24 horas con formol salino tamponado al 10%. A continuación se deshidrataron en baños crecientes de alcohol etílico y finalmente en xilol. Una vez deshidratado el tejido se incluyó en parafina líquida a 56°C hasta su posterior análisis.

Los bloques incluidos en parafina se cortaron en secciones de 4µm de grosor con un micrótopo de rotación (Leiz 1512, IMEB INC, CH, USA).

Para valorar el contenido en colágeno total del tejido, las secciones obtenidas se teñieron con rojo picrosirio. Partiendo de las secciones teñidas con rojo picrosirio y mediante la iluminación con luz polarizada se realizó el estudio de colágeno soluble y no soluble.

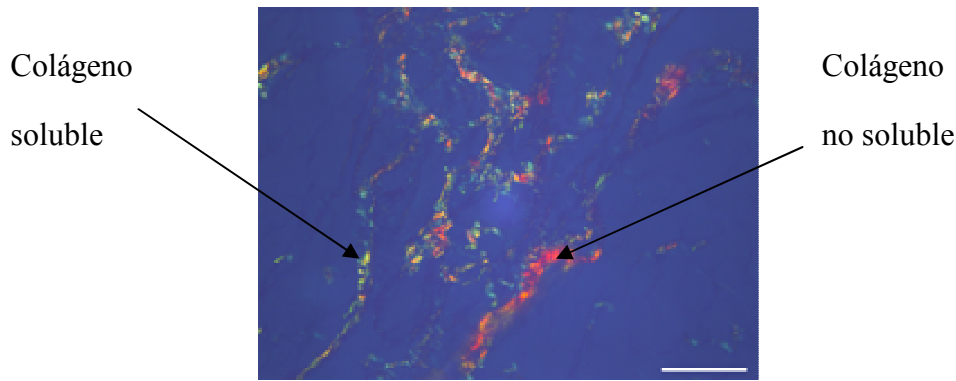


Figura 19: Imagen obtenida mediante la iluminación de luz polarizada sobre cortes histológicos teñidos con rojo picrosirio.

Con objeto de valorar el área de los cardiomiocitos, las secciones obtenidas se tiñeron con Tricrómico de Masson midiéndose el área de los cardiomiocitos que habían sido cortados transversalmente (sólo aquellos en los que el núcleo estaba en posición central). Se midieron entre 80-100 cardiomiocitos en cada corte.

Con objeto de valorar el área de la media y del lumen de los vasos estudiados, las secciones obtenidas se tiñeron con hematoxilina-eosina. Con objeto de evitar posibles errores de los datos debido a la posible deformación de los vasos generada durante su preparación, corregimos el área estudiada mediante la corrección de la zona de la sección transversal delimitada por la lámina elástica interna o externa, aplicando el factor $l^2/4\pi$ para la medida de la lámina, donde l es la longitud de la lámina (de las et al., 1999). El grosor de la media de la aorta se obtuvo mediante el promedio de entre 8-10 regiones diferentes cuantificadas mediante un analizador de imagen (LEICA Q550 IWB).

Se realizaron fotografías de los cortes teñidos mediante el empleo de una cámara conectada a un microscopio óptico (Leica DM 2000) y se cuantificó mediante un analizador de imagen (LEICA Q550 IWB).

II.5. Estudios de composición de la aorta.

Segmentos de aorta torácica se abrieron longitudinalmente, se separó la adventicia de la media y se midió la longitud de la media bajo un microscopio. De la media se limpió toda la grasa, se secó y se pesó. Las proteínas celulares de la media fueron extraídas con

SDS (0.3%). La elastina insoluble fue purificada por el método alcalino caliente y cuantificada mediante peso.

Las proteínas en el extracto de NaOH se hidrolizaron y el colágeno total de la media se cuantificó mediante el ensayo de hidroxiprolina en el hidrolizado, utilizando un ensayo colorimétrico.

II.6. Detección *in situ* de la producción de O_2^- .

La detección *in situ* de la producción de radicales O_2^- se realizó mediante la técnica del dihidroetidio (DHE). Previamente, el tejido fue incluido en OTC y congelado a -80°C . Posteriormente se realizaron cortes histológicos de $14\ \mu\text{m}$ de grosor mediante el empleo de un criostato (Leica, JUNG CM1800), que se fijaron en portas tratados con APS. A continuación se dejaron secar los cortes a 37°C durante al menos 1 hora para prevenir que se despeguen los cortes. Pasada esa hora, los cortes se incubaron durante 30 minutos con KHB-HEPES (Anexo b) a 37°C utilizando una cámara húmeda protegida de la luz. A continuación, las preparaciones se incubaron con DHE (5×10^{-6} mol/L) durante 30 minutos a 37°C . Se realizaron distintas fotografías del mismo corte hasta haber fotografiado la totalidad del corte con un microscopio de fluorescencia (Leica DMI 3000) usando un objetivo de 40x. Las condiciones del microscopio y de la cámara fotográfica fueron mantenidas constantes para todas las preparaciones.

La intensidad de fluorescencia en el núcleo celular fue cuantificada usando el software MetaMorph Metamorph 7.0, Molecular Devices Corporation, USA.

II.7. Western blot.

Alícuotas de $40\ \mu\text{g}$ de proteínas fueron desnaturalizadas calentándolas a 95°C durante 5 minutos en presencia de β -Mercaptoetanol y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Para llevar a cabo la electroforesis, se prepararon geles inferiores de acrilamida a diferentes concentraciones para separar las proteínas a estudiar. Posteriormente, se preparó un gel superior con una concentración de acrilamida al 4%. Una vez completada la carga en los geles superiores, se sumergió todo el sistema en la solución de electroforesis (Anexo a) y se aplicó una corriente a un

amperaje constante de 50 mA durante una hora y media aproximadamente, creando un campo eléctrico que separó las proteínas de las muestras. Una de las calles del gel se empleó para el marcador de peso molecular conocido.

Finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) mediante transferencia semi-seca hidratando las membranas en un tampón de transferencia (Anexo a), la transferencia se realizó aplicando una corriente a voltaje constante de 20 voltios durante una hora a temperatura ambiente.

Para la inmunodetección se bloquearon las membranas en PBS-Tween al 0.1% con un 7.5% de leche en polvo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Las condiciones de cada inmunodetección, incluyendo las condiciones de incubación con el anticuerpo primario y de incubación con el anticuerpo secundario son específicas para cada proteína a estudiar y se encuentran resumidas en los siguientes puntos.

El revelado empleado para visualizar las proteínas fue la quimioluminiscencia usando el sistema ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

II.7.1. Proteínas de la matriz extracelular y proteínas implicadas en su balance.

Para llevar a cabo la electroforesis se prepararon geles inferiores de acrilamida a distintas concentraciones para separar las proteínas colágeno tipo I, colágeno tipo III, fibronectina, MMP-2, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, elastina TGF- β , Galectina-3, CTGF y β -actina como se resume en la tabla 2. Posteriormente, se procedió como en el apartado II.6.

Parámetro	Col-I	Fibronectina TIMP-3 Col-III	Elastina MMP-2 MMP-13	TGF- β	Gal-3	CTGF TIMP-1 TIMP-2	β -Actina
Gel inferior							
%	7.5%	10%	10%	12.5%	12.5%	20%	7.5-20%
Acrilamida							
Anticuerpo primario							
Dilución	1:1000	1:500	1:500	1:1000	1:2000	1:500	1:10000
Tampón	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST0.1%
Tiempo	Overnight	1 hora	1 hora	Overnight	1 hora	Overnight	30 min
T ^a	4°C	20-22°C	20-22°C	4°C	20-22°C	4°C	20-22°C
Anticuerpo secundario							
Dilución	1:5000	1:500	1:500	1:5000	1:5000	1:500	1:5000
Tampón	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST0.1%
Tiempo	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	30 min
T ^a	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C

Tabla 2: Condiciones de inmunodetección para cada proteína.

II.7.2. Proteínas de señalización intracelular.

Parámetro	p70-P p70	Akt
Gel inferior		
% Acrilamida	12.5%	10%
Anticuerpo primario		
Dilución	1:1000	1:500
Tampón	TBST 0.1%	TBST 0.1%
Tiempo	Overnight	Overnight
T^a	4°C	4°C
Anticuerpo secundario		
Dilución	1:1000	1:500
Tampón	TBST 0.1%	TBST 0.1%
Tiempo	1 hora	1 hora
T^a	20-22°C	20-22°C

Tabla 3. Condiciones de inmunodetección para cada proteína.**II.8. RT-PCR en tiempo real.****II.8.1. Transcripción reversa.**

El ARN se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) empleando la transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. La retrotanscripción del ARNm se realizó en un volumen de 20µl. De cada muestra se incubaron 5µg de ARN, con un cebador de Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500ng) el cual hibrida con la cola Poli-A del ARNm, a una temperatura de 70°C (temperatura del hibridación del cebador) durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron los reactivos para la retrotranscripción cuyas concentraciones fueron: 1x de tampón de reacción RT, dNTPs (1 mM), DTT (10 mM), PowerScriptTM-RT (0.125 U/µl). La reacción se realizó en un termociclador durante 90 minutos a 42°C, tras este período la enzima se inactivó calentando la mezcla de reacción a 70°C durante 15

minutos. Una vez finalizada la reacción, las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

II.8.2. PCR en tiempo real.

La PCR se llevó a cabo utilizando el kit Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche. El SYBR Green es un colorante que se une al ADN de doble cadena por el surco menor del ADNds incrementando su fluorescencia unas cien veces.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se preparó añadiendo: 5 µl de cada muestra estando todas las muestras a la misma concentración de ADNc, 6 µl de agua ultrapura, 0.75 µl de cebador sentido, 0.75 µl de cebador antisentido y 12.5 µl de la mezcla Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche la cual contiene dNTP, la polimerasa Fast Start y el fluorocromo SYBR Green. Los cebadores usados son específicos para las secuencias de rata. Se utilizó HPRT como gen de control endógeno. La cuantificación relativa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del software MyiQ (Bio-Rad). La temperatura de hibridación de todos los cebadores se ajustaron con un termociclador clásico, las secuencias se muestran en la tabla 4.

Genes	T ^a	Cebador sentido	Cebador antisentido
Coll1a1	62°C	GCCTCCCAGAAC ATC ACC TA	ATGTCTGTCTTGCCCCAAGT
Col3a1	62°C	CTCACCTGCTTCACCCC TCT C	TGGACATATTGCACAACATTC TC
FN	62°C	GGGGTCACGTACCTCTTCAA	TGGAGGTTAGTGGGAGCATC
TGF-β	62°C	CAGAAGTTGGCATGGTAGCC	TGCTTCAGCTCCACAGAGAA
Gal-3	60°C	AGCCCAACGCAAACAGTATC	GGCTTCAACCAGGACCTGTA
CTGF	60°C	GAGTCGTCTCTGCATGGTCA	CCACAGAACTTAGCCCGGTA
Leptina	60°C	ACCAAAACCCTCATCAAGACCA	AAGTCCAAACCGGTGACCC
HPRT	60°C	AGG ACC TCT CGA AGT GT	ATTCAAATCCCTGAAGTACTCAT

Tabla 4: Secuencias primers para cada gen

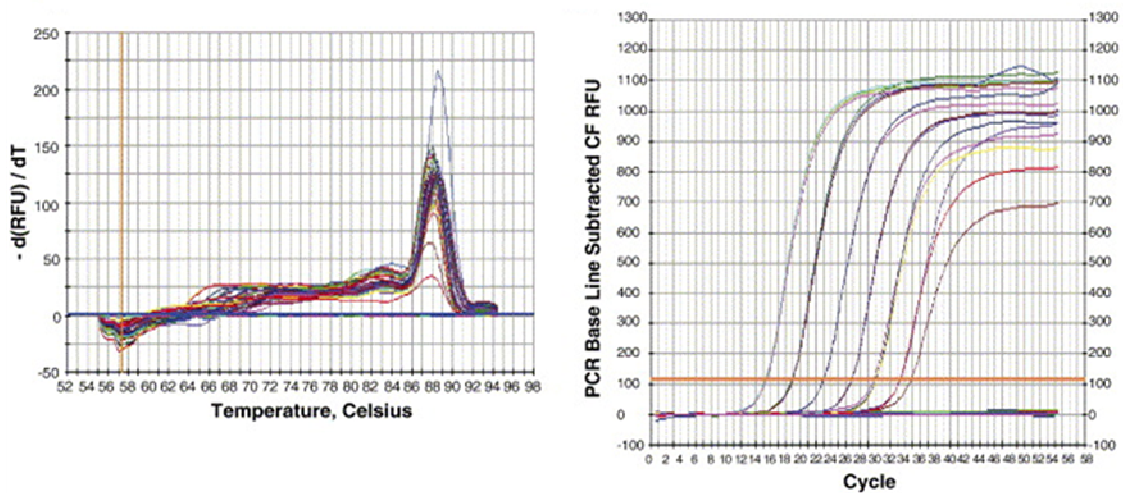


Figura 20: Esquema representativo de curva de desnaturalización y del resultado de la PCR en tiempo real.

III. ESTUDIO *IN VITRO*.

III.1 Modelo experimental.

III.1.1. Animales.

Para la obtención de células se utilizaron ratas macho Wistar (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Todas las manipulaciones de los animales fueron aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense de Madrid, siguiendo las guías éticas de cuidado de animales de experimentación de la Comunidad Europea. Los animales llegaron al animalario con 250 g de peso aproximadamente y fueron cuidadosamente identificados según la procedencia del animal y el nombre del investigador. El recinto donde se acondicionó a los animales se mantuvo en condiciones constantes de temperatura (20-22°C) y de humedad (50-60%), con renovaciones de aire cada hora, ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y con acceso libre al agua y al alimento.

Previa anestesia con una mezcla de ketamina (Imalgene 1000) 70mg/kg y xilacina (Rompun 2%) 6mg/kg, los animales se sacrificaron por decapitación mediante el

empleo de una guillotina. El efecto de la anestesia se evaluó mediante métodos veterinarios estandarizado que incluyen la ausencia de reflejos musculares (retirada de la pata después de un pellizco en los dedos del pie), pérdida del tono de la mandíbula y de los reflejos oculares y el cambio en el tamaño de la pupila. Una vez sacrificados los animales se procedió a la extracción del corazón y de la aorta torácica para la extracción tanto de cardiofibroblastos como de células de músculo liso.

III.1.2. Extracción de cardiofibroblastos.

No miocitos de ratas macho adultas se obtuvieron mediante centrifugación diferencial de células cardíacas liberadas tras perfusión retrograda Langerdorf y digestión enzimática de los corazones. El sistema Langerdorf fue descrito originalmente por Jacobson y Piper (Jacobson and Piper, 1986) y posteriormente modificado por Mitcheson, Hancox y Levi (Mitcheson et al., 1998). Tras la extracción, los corazones fueron perfundidos durante 2-3 minutos a 36-37°C con una solución Tyrode libre de calcio para limpiar el corazón de restos de sangre y desestructurar las uniones intercelulares adherentes tipo *fascia adherens* y desmosomas.

Posteriormente, se añadió la misma solución Tyrode que contenía 251 UI de colagenasa tipo II (Worthington) y 0.1 mmol/L de CaCl₂ para favorecer la digestión del tejido desestructurando la matriz extracelular.

Al final del período de perfusión, el corazón se extrajo del sistema Langerdorff y se cortó en trozos pequeños y se agitó suavemente en una solución que contenía 1mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). Los fibroblastos se obtuvieron tras centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 10°C.

Enriquecimiento, siembra y mantenimiento

El sedimento resultante se resuspendió en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) suplementado (Anexo c) y se sembró en placas de cultivo preincubadas durante 2 horas a 37°C con polilisina-L (0.1 mg/ML, Sigma).

Los cardiofibroblastos se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una atmósfera con un 5% de CO₂. Cada 2 días se cambió el medio de cultivo por medio nuevo, descartando las células que no se habían adherido al sustrato,

hasta que el cultivo celular llegó a un 80% de confluencia y se realizó un cambio de pase con tripsina al 0.25% en 0.01% de EDTA, hasta un máximo de 4 pases.

Caracterización de la estirpe celular.

Las células se fijaron en 4% de paraformaldehído durante 30 minutos y se permeabilizaron con 1% de Triton X-100. La preincubación se llevó a cabo durante 30 minutos en una solución de PBS que contenía 30% de suero normal de caballo. Posteriormente, las células se incubaron toda la noche a 4°C en una solución con una dilución 1/100 anti-vimentina (Novocastra, LeycaByosystems, Newcastle, UK) y 1/100 anti- α -SMA (Oncogene Biocare medical, Concord, CA). Tras 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS, las células fueron incubadas durante 1 hora en fluoresceína o Texas red horse anti-mouse IgG (Vectastin Vector) 1/200 en PBS. Los núcleos fueron teñidos con un marcador fluorescente de ADN, el 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich, Germany). Las imágenes se previsualizaron y se fotografiaron con el objetivo 40X en un microscopio de fluorescencia Leica DMI 3000 B.

III.1.3. Extracción de células de músculo liso.

Células de músculo liso fueron aisladas de la aorta torácica de ratas macho Wistar. Para ello se extrajeron las aortas torácicas y se colocaron en una placa Petri con PBS, donde se limpiaron de restos de sangre y tejido graso. A continuación a las aortas se les retiró la adventicia y el endotelio, quedándonos únicamente con la media.

Para favorecer la digestión del tejido, la media de las aortas se cortó en trozos pequeños y se incubó a 37°C durante 3 horas con una solución de digestión consistente en colagenasa tipo II (Sigma), elastasa (Sigma) y PBS. Transcurrido el período de 3 horas, la solución resultante se centrifugó a 1100 rpm durante 5 minutos.

Enriquecimiento, siembra y mantenimiento

El sedimento resultante se resuspendió en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) suplementado (Anexo c) y se sembró en flask de cultivo celular de 75 cm².

Las células de músculo liso se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una humedad relativa del 95% y una atmósfera con un 5% de CO₂. Cada 2 días se cambió el medio de cultivo por medio nuevo, descartando las células que no se habían adherido al sustrato, hasta que el cultivo celular llegó a un 80% de confluencia y se realizó un cambio de pase con tripsina al 0.25% en 0.01% de EDTA, hasta un máximo de 7 pases.

III.1.4. Estudios del papel de la leptina en cardiofibroblastos.

Efectos de la leptina sobre la matriz extracelular.

Transcurridas 24 horas de cultivo de las células con medio libre de suero, se estimularon los cardiofibroblastos con leptina (10-100 ng/ml) durante 6-24 horas.

En los estudios cuyo fin era valorar la posible implicación del estrés oxidativo, de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y de la galectina-3 en los efectos ejercidos por la leptina sobre la matriz extracelular, se preincubaron las células, durante 30 minutos antes de añadir la leptina, con un antioxidante general, la melatonina (10⁻³ mmol/L, Sigma), un inhibidor de la vía mTOR como es la rapamicina (10⁻⁴ mmol/L, Sigma) y un inhibidor de la actividad de la galectina-3, el N-acetilglucosamina (LacNac, 10⁻³ mmol/L, Sigma).

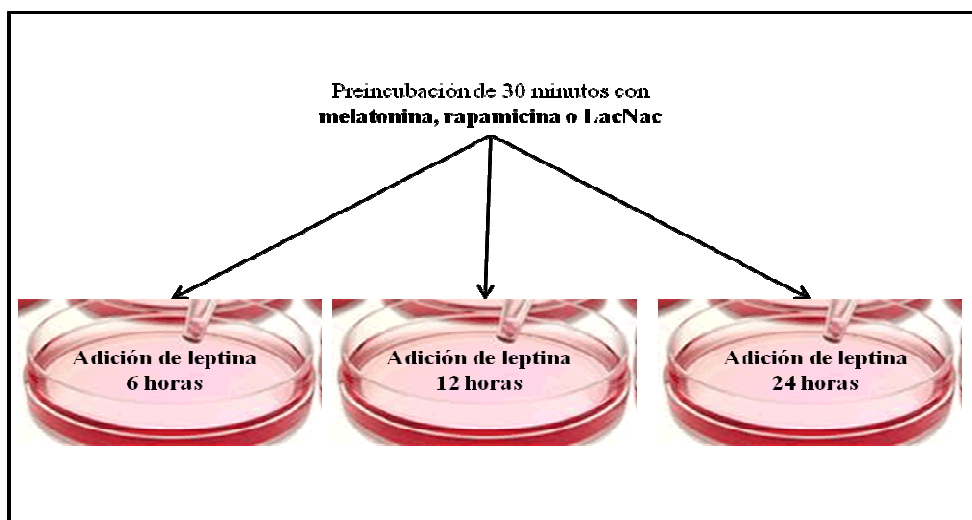


Figura 21: Esquema representativo del protocolo experimental en cardiofibroblastos de rata adulta para llevar a cabo estudios sobre la matriz extracelular.

Efectos de la leptina sobre la producción de aniones superóxido O_2^-

La valoración de producción celular O_2^- se realizó utilizando la técnica del dihidroetidio (DHE).

Transcurridas 24 horas de cultivo de las células con medio libre de suero, se sembraron en placas de 48 pocillos tratadas con polilisina-L a 0.1 mg/ml. Posteriormente, se estimularon los cardiofibroblastos con leptina (10-100 ng/ml) durante 6-24 horas.

En los estudios cuyo fin era valorar la posible activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y de la implicación de la galectina-3, en los efectos ejercidos por la leptina sobre la producción de O_2^- , se preincubaron las células, durante 30 minutos antes de añadir la leptina, con un antioxidante general como es la melatonina (10^{-3} mmol/l), un inhibidor de la vía mTOR como es la rapamicina (10^{-4} mmol/L) y un inhibidor de la actividad de la galectina-3 como es el LacNac (10^{-3} mmol/L, Sigma).

III.1.5. Estudios del papel de la leptina en células de músculo liso.

Efectos de la leptina sobre la matriz extracelular.

Transcurridas 24 horas de cultivo de las células con medio libre de suero, se estimularon las células de músculo liso con leptina (100 ng/ml) 24 horas.

En los estudios cuyo fin era valorar la posible implicación del estrés oxidativo y de la activación de la vía PI3K/Akt en los efectos ejercidos por la leptina sobre la matriz extracelular, se preincubaron las células, durante 30 minutos antes de añadir la leptina, con un antioxidante general, la melatonina (10^{-3} mmol/L, Sigma) y un inhibidor de la vía PI3K/Akt como es el LY294002 (2×10^{-4} mmol/L, Sigma).

III.2. Procesamiento de las muestras celulares para su análisis.

III.2.1. Extracción de proteínas totales a partir de los cultivos celulares.

Las células destinadas a la extracción de proteínas se sembraron en placas de 60 mm de diámetro cada una. Las células se recogieron mediante tripsinización, centrifugándolas a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 75 µl de buffer de lisis (Anexo a) y se incubó durante 30 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 13000 rpm durante 12 minutos a 4°C. El sobrenadante con la solución de proteína total se congeló a -80°C hasta su posterior cuantificación.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la utilización de un colorante, el azul de Coomassie.

III.2.2. Extracción de ARN mensajero.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos de 10 cm² cada uno. Se añadió 1 ml de Trizol en cada pocillo. El Trizol produce la ruptura de las células al disolver lípidos y precipitar proteínas preservando la integridad del RNA. Se pipeteó repetidamente para que las células se separaran en su totalidad de la placa, y se guardó a -80°C. Posteriormente se procedió según el apartado II.2.2.

III.3. Western blot.

Alícuotas de 40 µg de proteínas fueron desnaturalizadas calentándolas a 95°C durante 5 minutos en presencia de β-Mercaptoetanol y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Posteriormente se procedió según el apartado II.6.

III.3.1. Proteínas de la matriz extracelular y proteínas implicadas en su balance.

Para llevar a cabo la electroforesis se prepararon geles inferiores de acrilamida a distintas concentraciones para separar las proteínas colágeno tipo I, colágeno tipo III, TGF-β, Galectina-3, CTGF, fibronectina, elastina y β-actina como se resume en la tabla 5. Posteriormente, se procedió como en el apartado II.6.

Parámetro	Col-I/III	Fibronectina	Elastina	TGF- β	Gal-3	CTGF	β -Actina
Gel inferior							
% Acrilamida	7.5%	10%	10%	12.5%	12.5%	20%	7.5-20%
Anticuerpo primario							
Dilución	1:1000	1:500	1:500	1:1000	1:2000	1:1000	1:10000
Tampón	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%
Tiempo	Overnight	1 hora	1 hora	Overnight	1 hora	Overnight	30 min
T^a	4°C	20-22°C	20-22°C	4°C	20-22°C	4°C	20-22°C
Anticuerpo secundario							
Dilución	1:5000	1:500	1:500	1:5000	1:5000	1:5000	1:5000
Tampón	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%	PBST 0.1%
Tiempo	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	1 hora	30 min
T^a	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C	20-22°C

Tabla 5: Condiciones de inmunodetección para cada proteína.

III.3.2. Proteínas de señalización intracelular.

Parámetro	p70-P	Akt
	p70	
Gel inferior		
% Acrilamida	12.5%	10%
Anticuerpo primario		
Dilución	1:1000	1:500
Tampón	TBST 0.1%	TBST 0.1%
Tiempo	Overnight	Overnight
T ^a	4°C	4°C
Anticuerpo secundario		
Dilución	1:1000	1:500
Tampón	TBST 0.1%	TBST 0.1%
Tiempo	1 hora	1 hora
T ^a	20-22°C	20-22°C

Tabla 6: Condiciones de inmunodetección para cada proteína.

III.4. RT-PCR en tiempo real.

Se procedió según el apartado II.7. Se utilizaron los siguientes cebadores específicos para rata.

Genes	T ^a	Cebador sentido	Cebador antisentido
Col1aI	62°C	GCCTCCCAGAAC ATC ACC TA	ATGTCTGTCTTGCCCCAAGT
FN	62°C	GGGGTCACGTACCTCTTCAA	TGGAGGTTAGTGGGAGCATC
TGF-β	62°C	CAGAAGTTGGCATGGTAGCC	TGCTTCAGCTCCACAGAGAA
Gal-3	60°C	AGCCCAACGCAAACAGTATC	GGCTTCAACCAGGACCTGTA
CTGF	60°C	GAGTCGTCTCTGCATGGTCA	CCACAGAACTTAGCCCGGTA
HPRT	60°C	AGG ACC TCT CGA AGT GT	ATT CAA ATC CCT GAA GTA CTC AT

Tabla 7: Secuencias primers para cada gen.

III.5. Estudios de la producción intracelular de aniones superóxido.

La medida intracelular de aniones superóxido (O_2^-) se realizó mediante la técnica del dihidroetidido (DHE), previamente descrita (Lodi et al., 2006). El DHE es un compuesto que entra en las células y es oxidado por los radicales a O_2^- etidio, el cual se une al ADN dando lugar a una fluorescencia de color rojo.

Las células destinadas a la medida de la producción O_2^- se sembraron en placas de 48 pocillos. Tras 24 horas de incubación de las células en presencia o en ausencia del estímulo a estudiar, se añadió 5×10^{-6} mol/L DHE durante 30 minutos en una cámara húmeda protegida de la luz a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente se procedió según el apartado II.5.

III.6. Estudios de actividad de metaloproteinasas (MMPs).

La actividad de las MMPs fue estudiada mediante la técnica de zimografía. La zimografía es una técnica electroforética que permite observar la actividad de las enzimas. Dicha técnica se basa en la capacidad de la degradación de colágeno degradado por parte de las MMPs.

Alicuotas de 30 μ l del medio donde las células fueron estimuladas, se separaron mediante el uso de geles de acrilamida. La polimerización de los geles se realizó en presencia de gelatina soluble. De esta manera el gel resultante contiene gelatina (colágeno desnaturalizado). Posteriormente, se preparó un gel superior con una concentración de acrilamida al 4%. Una vez completada la carga en los geles superiores, se sumergió todo el sistema en la solución de electroforesis (Anexo a) y se aplicó una corriente a un amperaje constante de 50 mA durante una hora y media aproximadamente creando un campo eléctrico que separó MMPs. Una de las calles del gel se empleó para el marcador de peso molecular conocido.

Durante la electroforesis, el SDS causa la desnaturalización de las MMPs volviéndolas inactivas. Finalizada la electroforesis, el gel es lavado 3 veces de 10 minutos cada una con Triton X-100 al 2.5%, eliminando de esta manera el SDS, renaturalizando y recuperando la actividad de las MMPs. A continuación, los geles se incubaron en una tampón de incubación (Anexo a) durante 48 horas a 37°C favoreciendo la digestión de la gelatina por parte de las MMPs. Tras la incubación, el gel se tiñó con Coomassie Blue (BioRad) durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente los geles se lavaron con agua para retirar el exceso de Coomassie detectando las bandas blancas en contraste con el fondo azul del sustrato que no había sido degradado.

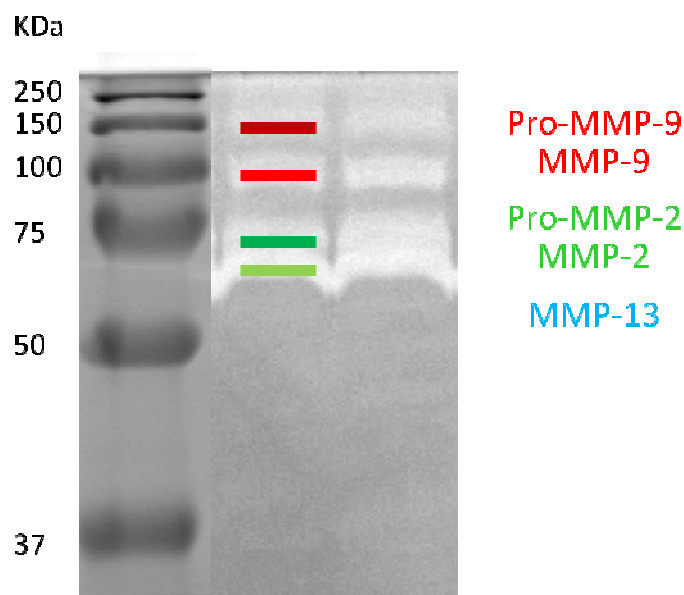


Figura 22: Foto representativa del resultado de la actividad de MMPs.

IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

IV.1. Análisis de datos del estudio clínico.

Las variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar. Se verificó la normalidad de las distribuciones mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Las variables categóricas se expresan en valor absoluto y porcentaje. Para las variables continuas, se empleó el test de la t de Student. Las diferencias en las distribuciones de los patrones geométricos del VI se analizaron mediante el test de McNemar para muestras relacionadas, basado en la distribución χ^2 . Las diferencias en las variables continuas se analizaron mediante el test de la t de Student o el correspondiente test no paramétrico, según fuera adecuado. Los coeficientes de correlación beta junto con sus intervalos de confianza del 95% (IC95%) se obtuvieron a través de un modelo de regresión lineal para explicar la disfunción diastólica o mediante un modelo logístico para explicar la hipertrofia ventricular. Se empleó un valor de $p < 0,05$ como punto de corte para definir la significación estadística. El análisis de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS Versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

IV.2. Análisis de datos del modelo experimental.

Los resultados se expresaron como el valor de la media aritmética \pm error estándar de la media ($\bar{x} \pm EEM$). En todos los casos se consideró que existían diferencias significativas para valores de $p < 0.05$.

La normalidad de distribución se verificó por medio del test Kolmogorov-Smirnov.

La correlación Pearson fue utilizada para examinar la asociación entre diferentes variables.

Los datos se analizaron usando un análisis de varianza, seguido de un test Newman-Keuls o Bonferroni para evaluar las diferencias específicas entre las dosis o las condiciones basales respectivamente.

Los cálculos estadísticos se analizaron utilizando el programa GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, USA).

V. ANEXO (REACTIVOS).

a) Análisis de proteínas.

Buffer de lisis de extracción celular

Tris.....	20 mM	}	pH=7.5
NaCl.....	150 mM		
Tritón X-100.....	1%		
PMSF.....	0.1 mM		
DTT.....	3 µM		
Inhibidor de proteasas.....	1 pastilla en 10 ml de solución de lisis		

Buffer de lisis de extracción tisular

Tris.....	150 mM	}	pH=7.5
NaCl.....	50 mM		
Tritón X-100.....	1%		
PMSF.....	1 mM		
DTT.....	3 mM		
Inhibidor de proteasas.....	1 pastilla en 10 ml de solución de lisis		

Solución de electroforesis

Tris.....	50 Mm
Glicina.....	192 mM
SDS.....	0.3%

Tampón de transferencia

Tris.....	50 Mm
Glicina.....	40 mM
SDS.....	0.1%
Metanol.....	20%

PBS

NaCl.....	140 mM	}	pH=7.4
KCl.....	3 mM		
Na ₂ HPO ₄	9 mM		
KH ₂ PO ₄	2 mM		

Tampón de incubación para zimografía

Tris (pH=7.5).....	50 mM
CaCl ₂	10 mM
NaCl.....	10 mM
Tritón X-100.....	1%

b) Detección O₂⁻.

KHB-HEPES

CaCl ₂ • 2H ₂ O.....	2 mM	}	pH=7.4
NaCl.....	130 mM		
KCl.....	5.6 mM		
MgCl ₂ • 6 H ₂ O.....	250 μM		
Hepes.....	8.4 mM		
Glucosa.....	10 mM		

c) Cultivo celular.

Suplemento para el medio de cultivo DMEM utilizado para cardiofibroblastos.

FBS.....	10%
HEPES.....	2 mM
Piruvato.....	1%
L-Glutamina.....	1%
Penicilina/Estreptomicina.....	1%

Suplemento para el medio de cultivo DMEM F-12 utilizado para células de músculo liso.

FBS.....10%

Penicilina/Estreptomicina.....1%

Resultados

I. MODIFICACIONES ANATOMOFUNCIONALES DEL CORAZÓN EN LA OBESIDAD MÓRBIDA.

I.1. Datos epidemiológicos. Efectos de la obesidad sobre parámetros metabólicos y presión arterial.

La media de edad del grupo de pacientes fue de 42 años, siendo similar tanto en el grupo control como en los pacientes que sufrían obesidad mórbida. De los 133 individuos con obesidad mórbida, 106 (79,7%) eran mujeres. El IMC promedio de los obesos fue de 46,38 kg/m², mientras que el de los controles fue de 22,79 kg/m² (Tabla 8).

Los valores de presión arterial también fueron superiores en el grupo de los obesos, tanto en lo referente a la presión arterial sistólica como a la diastólica ($p < 0,0001$). En promedio, el grupo de obesos se encontró dentro del rango de prehipertensión según la clasificación del JNC7, a expensas del valor de la presión arterial sistólica (Chobanian et al., 2003) (Tabla 8).

En cuanto al perfil metabólico, los individuos del grupo de obesos presentaron cifras de los componentes del perfil lipídico y de glucemia (glucosa e insulina) significativamente superiores al grupo de controles. Asimismo se vio un incremento 3 veces mayor en el índice HOMA, reflejando la resistencia a la acción de la insulina existente en los individuos con obesidad mórbida ($p < 0.0001$) (Tabla 8).

Presentaron comorbilidades asociadas el 85,4 % de los individuos obesos. Entre ellas, la más frecuente fue la hipertensión (47.7%), seguida por la dislipemia (40.8%) (Tabla 8). Cabe destacar que ninguno de los pacientes del grupo control era diabético.

	Control	Obeso	p
Edad (años)	41,43±5,12	42,03±10,35	0,567
Mujeres (%)	40 (59,7)	106 (79,7)	0,004
Talla (m)	1,68±0,09	1,62±0,09	<0,0001
Peso corporal (kg)	64,46±10,10	121,40±20,11	<0,0001
IMC (kg/m²)	22,79±1,97	46,38±5,41	<0,0001
PAS (mmHg)	110,62±12,13	126,15±17,90	<0,0001
PAD (mmHg)	66,92±7,67	77,15±11,86	<0,0001
FC (lpm)	66,22±10,44	73,57±12,23	<0,0001
Glucemia (mg/dl)	87,31±9,47	101,34±22,27	<0,0001
Colesterol total (mg/dL)	220,54±180,57	179,87±40,57	0,073
Colesterol-LDL (mg/dL)	120,73±26,12	107,83±36,76	0,007
Colesterol-HDL (mg/dL)	61,27±14,22	42,33±11,95	<0,0001
Triglicéridos (mg/dL)	85,31±56,25	153,98±84,05	<0,0001
Insulina (pg/mL)	163,51±62,93	372,92±264,43	<0,0001
Índice HOMA	0,79±0,33	2,38±2,77	<0,0001
Creatinina (mg/dL)	0,74±0,16	0,70±0,17	0,083
Comorbilidades			
HTA (%)	4 (6)	62 (47,7)	<0,0001
DM (%)		27 (20,8)	<0,0001
Dislipemia (%)	6 (9)	53 (40,8)	<0,0001
Tabaquismo (%)	5 (7,5)	39 (30)	<0,001
EPOC (%)		20 (15,4)	<0,0001

Tabla 8: Datos epidemiológicos y características clínicas. IMC: índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; FC: frecuencia cardíaca; índice HOMA: evaluación con el modelo homeostático; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Los datos se expresan como media ± desviación estándar o porcentaje de cada grupo.

I.2. Efectos sobre la estructura y función cardiaca.

En el grupo de individuos con obesidad mórbida, tanto el DTDVI como el DTSVI fueron significativamente mayores respecto al grupo control ($p < 0.0001$), así como el espesor del septo interventricular ($p < 0.0001$), y el de la pared posterior ($p < 0.0001$). En cualquier caso, los valores promedio de la masa ventricular indexada estuvieron dentro de los límites normales dentro del grupo de obesos (Tabla 9). El grosor parietal relativo fue similar y dentro de la normalidad en ambos grupos.

La función sistólica del VI fue normal en ambos grupos, si bien significativamente menor en el grupo de obesos frente al grupo control ($p < 0.0001$) (Tabla 9). No se encontraron diferencias significativamente estadísticas entre ambos grupos en cuanto a volumen/latido ni en el gasto cardiaco.

Se encontraron diferencias en los distintos parámetros de función diastólica entre ambos grupos. La relación E/A fue significativamente menor en el grupo de obesos ($p < 0.0001$), a expensas del aumento en la onda A ($p < 0.0001$) (Tabla 9). Mediante Doppler tisular de la velocidad del anillo mitral, la onda e' fue significativamente menor en el grupo de obesos que en el de controles ($p < 0.0001$). Asimismo, la relación E/e' fue normal en el grupo control (< 8), pero no en el grupo de obesos (Tabla 9).

	Control	Obeso	p
DTDVI (cm)	4,571±0,46	4,98±0,53	<0,0001
DTSVI(cm)	2,65±0,36	3,05±0,5	<0,0001
Grosor del septo (cm)	0,86±0,14	1,01±0,20	<0,0001
Grosor de la pared posterior (cm)	0,88±0,18	0,99±0,19	<0,0001
Grosor parietal relativo	0,39±0,10	0,40±0,09	0,425
Masa del VI indexada (g/m^{2,7})	76,66±16,74	50,35±12,73	0,012
FEVI (%)	72,73±5,06	68,24±7,75	<0,0001
Volumen/latido (ml)	80,14±95,84	74,62±47,03	0,673
Gasto cardiaco (l/min)	5,19±5,90	5,65±4,68	0,607
Parámetros de función diastólica			
Onda E (cm/s)	82,45±21,31	81,61±21,07	0,794
Onda A (cm/s)	57,11±13,69	73,39±18,77	<0,0001
Onda e' (cm/s)	13,20±2,59	9,57±3,47	<0,0001
Onda a' (cm/s)	9,47±2,06	9,66±2,79	0,602
Relación E/A	1,50±0,49	1,19±0,40	<0,0001
Relación E/e'	6,41±1,82	9,69±3,50	<0,0001

Tabla 9: Datos ecocardiográficos. DTDVI: diámetro telediastólico del VI; DTSVI: telesistólico del VI; FEVI: fracción de eyección del VI. Los datos se expresan como media ± desviación estándar de cada grupo.

I.3. Geometría del ventrículo izquierdo.

El 41% de los individuos con obesidad mórbida presentaban un patrón geométrico del VI normal (Tabla 10). El 59% restante presentaba alguna forma de remodelado ventricular, con más frecuencia de hipertrofia excéntrica, presente en el 25% de los individuos obesos, e hipertrofia concéntrica, en el 19,4% de los casos.

	Control (%)	Obeso (%)	p
Normal	77,3	41	<0,0001
Remodelado concéntrico	19,7	14,5	0,23
Hipertrofia concéntrica	1,5	19,4	<0,0001
Hipertrofia excéntrica	1,5	25,0	<0,0001

Tabla 10: Parámetros geométricos del ventrículo izquierdo. Los datos se expresan como porcentaje de cada grupo.

I.4. Efectos sobre parámetros circulantes.

Como se resume en la tabla 11, la obesidad se asoció con un incremento en los niveles circulantes de leptina ($p < 0.0001$) y una disminución en los de adiponectina ($p < 0.05$) (Tabla 11). Asimismo, se observó un incremento en mediadores de inflamación como PCR, PAI-1, IL-1 β , IL-6, TNF- α y MCP-1 (excepto para el caso de la IL-10), GLP-1, MMP-9, factores de daño oxidativo en el corazón como la MPO y también se vieron incrementos en parámetros de detección de insuficiencia cardíaca como son los niveles de NTproBNP (Tabla 11).

	Control	Obeso	p
Leptina (pg/mL)	5486,9±3522,8	29093,5±13777,2	<0,0001
Adiponectina (ng/mL)	39191,7±42770,3	22937,8±38576,9	0,029
GLP-1 (pg/mL)	19,18±7,56	22,86±8,99	0,016
MMP-9 (pg/mL)	140,83±85,96	250,82±185,87	<0,0001
MPO (pg/mL)	44,20±36,43	131,33±185,37	0,001
PCR (mg/dL)	0,15±0,36	1,32±1,23	<0,0001
PAI-1 (pg/mL)	31,94±15,57	51,99±30,80	<0,0001
IL-1β (pg/mL)	0,58±0,53	1,18±1,36	0,002
IL-6 (pg/mL)	3,34±3,43	13,99±20,97	<0,0001
IL-10 (pg/mL)	38,89±26,74	38,23±23,16	0,883
TNF-α (pg/mL)	8,96±3,83	18,71±8,58	<0,0001
MCP-1 (pg/mL)	199,67±73,92	247,02±92,37	0,002
NTproBNP (pg/mL)	7,60±7,63	15,28±15,18	0,001

Tabla 11: Parámetros circulantes. GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; MMP-9: metaloproteinasas-9; MPO: mieloperoxidasa; PCR: proteína C reactiva; tPAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; IL: interleuquina; TNF-α: factor de necrosis tumoral-alfa; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1; NTproBNP: péptido natriurético de tipo B. Los datos se expresan como media ± desviación estándar de cada grupo.

Los modelos finales se construyeron a partir de 58 individuos obesos y de 67 individuos pertenecientes al grupo control, que fueron utilizados para el cálculo de posibles variables que expliquen el cambio tanto en el patrón geométrico del VI como en la función diastólica.

Teniendo en cuenta el pequeño número de individuos con hipertrofia del VI entre los sujetos pertenecientes al grupo control, se agruparon los individuos a estudiar en función de presencia o ausencia de hipertrofia del VI, con el fin de identificar posibles variables que expliquen el cambio en dicho patrón geométrico (Tabla 12). Así podemos observar que tanto la propia obesidad, como los niveles circulantes de leptina y la relación E/e' son las variables con mayor significación que explican el cambio en el patrón geométrico observado en los individuos obesos.

	Exp β (IC95%)	p
Obesidad	73,70 (6,79 a 800,21)	<0,0001
Leptina	1,00 (1,00 a 1,00)	0,032
Relación E/e'	1,39 (1,07 a 1,79)	0,012

Tabla 12: Determinantes del cambio en el patrón geométrico. Análisis logístico.

Observados los cambios en la función diastólica mostrados en la tabla 9, se analizó la relación entre el cambio en dicha función y las variables clínicas estudiadas con la intención de identificar posibles variables que expliquen el cambio en la función diastólica (Tabla 13). Así podemos observar que el incremento en los niveles circulantes de leptina es la variable con mayor significación ($p < 0,0001$) que explica la disfunción diastólica observada en los individuos obesos. También se encontraron asociaciones con la hipertrofia ventricular, así como distintos marcadores proinflamatorios como son el TNF- α , el PAI-1, las IL-6 y la IL-10 como se muestra en la tabla 13.

	p	β (IC95%)
HVI	2,19 (0,66 a 3,71)	0,005
Leptina	0,12 (0,07 a 0,17)	<0,0001
PAI-1	-0,03 (-0,05 a -0,01)	0,003
IL-6	0,081 (-0,002 a 0,16)	0,055
IL-10	-0,02 (-0,04 a -0,003)	-0,024
TNF-α	0,09 (0,02 a 0,16)	0,013

Tabla 13: Determinantes de la disfunción diastólica. Análisis de regresión lineal. HVI: Hipertrofia ventrículo izquierdo.

II. EFECTOS CARDIOVASCULARES DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATA ADULTA.

II.1. Efectos de la obesidad inducida por dieta sobre el peso corporal, parámetros metabólicos y la presión arterial.

Desde la primera semana, la ganancia del peso corporal fue significativamente mayor (* $p < 0.05$) en el grupo de ratas alimentadas con la dieta con alto contenido en grasa en comparación con las alimentadas con la dieta estándar (CT).

Al final del experimento, el grupo de animales que recibió la dieta con alto contenido en grasa desarrolló obesidad (grupo OB) mostrando un incremento del 26% en el peso corporal en comparación con el grupo de animales que recibió la dieta estándar (** $p < 0.01$) (Tabla 14).

En cuanto al perfil metabólico, la dieta con alto contenido en grasa se asoció con cambios en el perfil lipídico y de glucemia ya que se produjo un incremento en los niveles de triglicéridos, de colesterol total, de glucosa y de insulina significativamente superiores al grupo de controles. Asimismo se vio un incremento 3 veces mayor en el índice HOMA, reflejando la resistencia a la acción de la insulina existente en el grupo de animales OB (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) (Tabla 14).

Del mismo modo, la dieta con alto contenido en grasa se asoció con un incremento significativo en los niveles circulantes de leptina al grupo CT (** $p < 0.01$) (Tabla 14).

	CT	OB
Peso corporal final (g)	321.2±9.7	362.7±8.6**
TG (mmol/l)	0.75±0.08	1.05±0.04**
Colesterol total (mmol/l)	0.69±0.05	0.91±0.08*
Colesterol-HDL (mmol/l)	25.29±1.82	30.86±2.27
Glucosa	4.34±0.05	4.80±0.09**
Insulina (pmol/l)	63.94±7.91	184.47±44.18
Indice HOMA	1.7±0.2	5.5±1.2**
Leptina (ng/ml)	12.5±1.8	69.4±16.2**

Tabla 14: Efectos de la obesidad inducida por dieta sobre el peso corporal y parámetros metabólicos en ratas. TG: triglicéridos; índice HOMA: evaluación con el modelo homeostático. Los datos representan la media±EEM de cada grupo (n=7) (*p<0.05; **p<0.01 vs.CT).

La dieta rica en grasa no modificó los niveles de presión arterial sistólica que fueron similares entre ambos grupos al final (Tabla 15).

	CT		OB	
Semana	0	6	0	6
PAS (mm Hg)	120.18±3.52	116.35±5.78	124.78±3.37	121.01±2.48

Tabla 15: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la presión arterial en ratas. PAS: presión arterial sistólica. Los datos representan la media±EEM de cada grupo (n=7).

II.2. Efectos cardiacos de la obesidad inducida por dieta.

II.2.1. Efectos sobre la función y estructura cardiaca.

El grupo de animales OB, mostró un incremento significativo en el peso relativo del corazón tras ser normalizado por la longitud de la tibia (14.2%) (*p<0.05) (Tabla 16).

En los parámetros de función cardiaca estudiados mediante ecocardiografía, no se encontraron diferencias en el diámetro del ventrículo izquierdo, ni en el grosor de la pared posterior ni del septo. Tampoco se encontraron diferencias en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo ni en el acortamiento fraccional entre ambos grupos de animales (Tabla 16).

	CT	OB
Peso relativo corazón (g/cm tibia)	0.021±0.001	0.024±0.001*
TBIV.	1.96±0.16	1.89±0.21
PP	2.25±0.2	1.65±0.28
DFS	2.6±0.29	2.16±0.29
DFD	4.8±0.16	3.99±0.4
FE	79.2±5.4	82.2±3.8
AF	44.2±5.1	46.2±4.1

Tabla 16: Efectos de la obesidad inducida por dieta sobre el peso relativo del corazón y parámetros ecocardiográficos en ratas. TBIV.: grosor del tabique interventricular en diástole; PPs: grosor de la pared posterior en diástole; DFS: diámetro del ventrículo izquierdo en fin de sístole; DFD: diámetro del ventrículo izquierdo en fin de diástole; FE: fracción de eyección del ventrículo izquierdo; AF: acortamiento fraccional. Los datos representan la media±EEM de cada grupo (n=7) (*p<0.05 vs. CT).

La administración de la dieta rica en grasa no generó ninguna modificación del área de los cardiomiocitos en comparación con las ratas alimentadas con una dieta estándar (Figura 23).

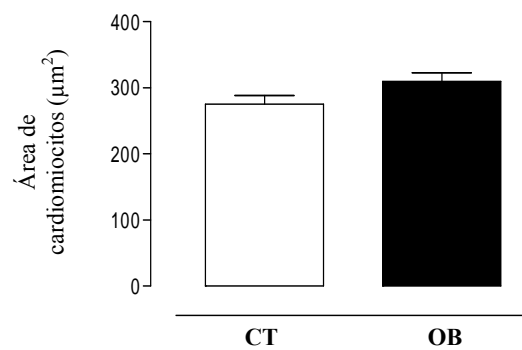
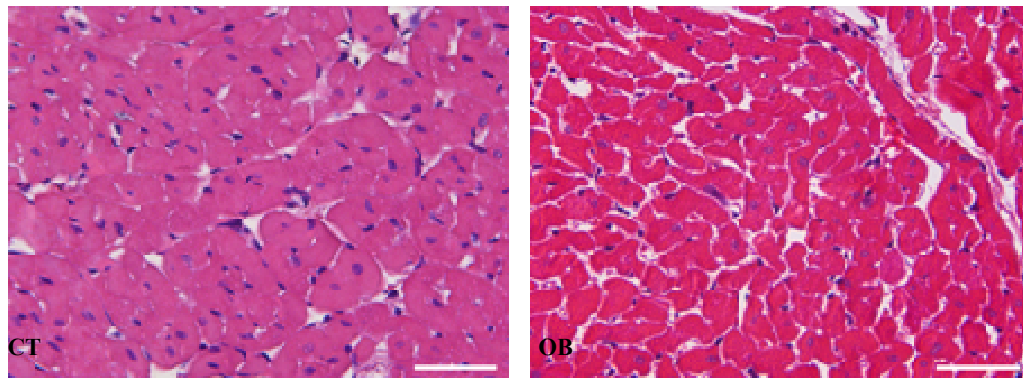


Figura 23: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre el área de los cardiomiocitos de rata. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con Tricrómico de Masson de corazones de rata. Aumento al 40X. Barra de escala 50 µm. Las gráficas representan la media±EEM de cada grupo (n=7) midiéndose entre 80-100 cardiomiocitos en cada corte.

En el grupo de animales que recibió la dieta con alto contenido en grasa observamos un incremento en el área de la media de la arteria coronaria descendente (**p<0.001) sin cambios significativos en el área de la luz, generando por tanto un incremento en el ratio media/lumen (**p<0.01) (Tabla 17).

	CT	OB
Área vaso (μm^2)	10770.46±1636.95	23096.75±3387.03**
Área lumen (μm^2)	5264.32±2806.56	7784.34±5719.55
Área media (μm^2)	5188.65±712.44	16065.81±2101.51***
Ratio media/lumen	1.103±0.363	2.805±1.420**

Tabla 17: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la morfometría de la arteria coronaria descendente en ratas. Los datos representan la media±EEM de cada grupo (n=7) (**p<0.01; ***p<0.001 vs. CT).

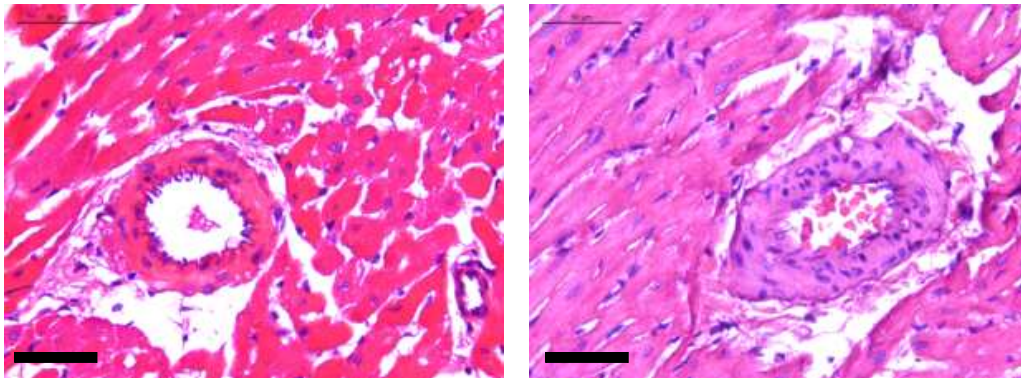


Figura 24: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la morfometría de la arteria coronaria descendente en ratas. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μm .

II.2.2. Efectos sobre la fibrosis cardiaca.

El grupo de animales que recibió la dieta con alto contenido en grasa mostró un incremento en la fibrosis intersticial cardiaca en comparación con el grupo de animales que recibió la dieta estándar (** $p < 0.001$) determinado por un incremento de la fracción de volumen de colágeno total (Figura 25).

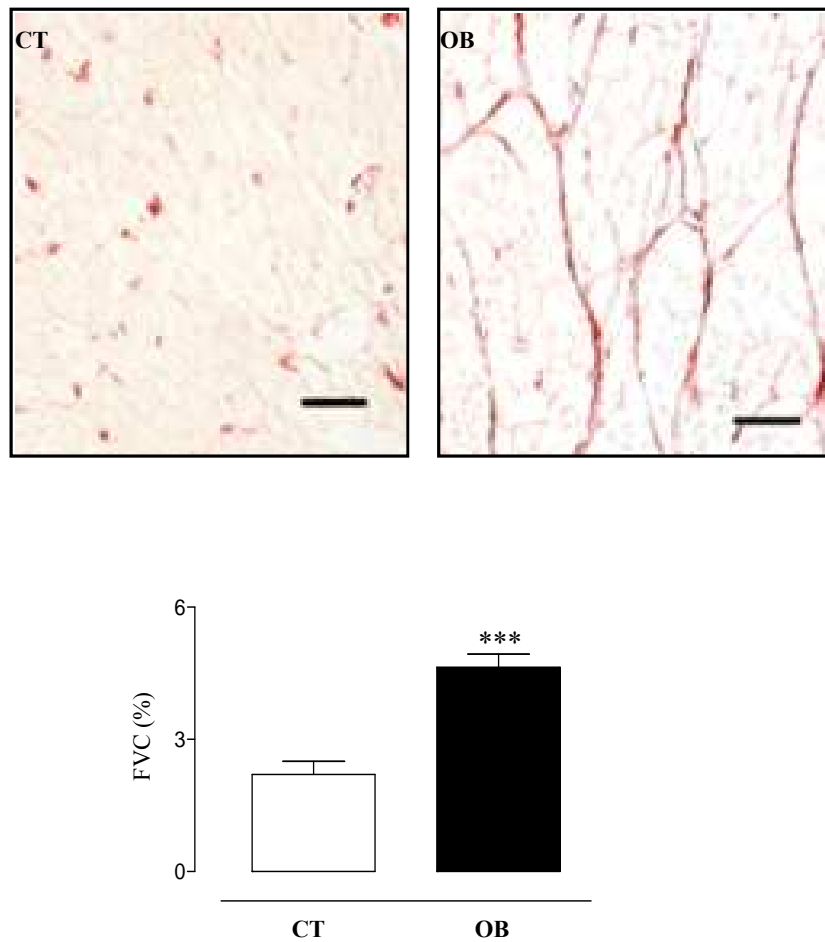


Figura 25: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la producción de colágeno total en el corazón de ratas. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con Rojo Sirio. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μm . Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas por porcentaje de área teñida (** $p < 0.001$ vs.CT).

Este incremento en los niveles de colágeno total además se ve acompañado por un incremento en los niveles de colágeno no soluble (***) $p < 0.001$ (Figura 26A) y una disminución en los niveles de colágeno soluble (***) $p < 0.001$ (Figura 26B) sugiriendo que este incremento de colágeno total es fundamentalmente debido a la colágeno menos soluble, es decir, con mayor resistencia a la degradación del mismo.

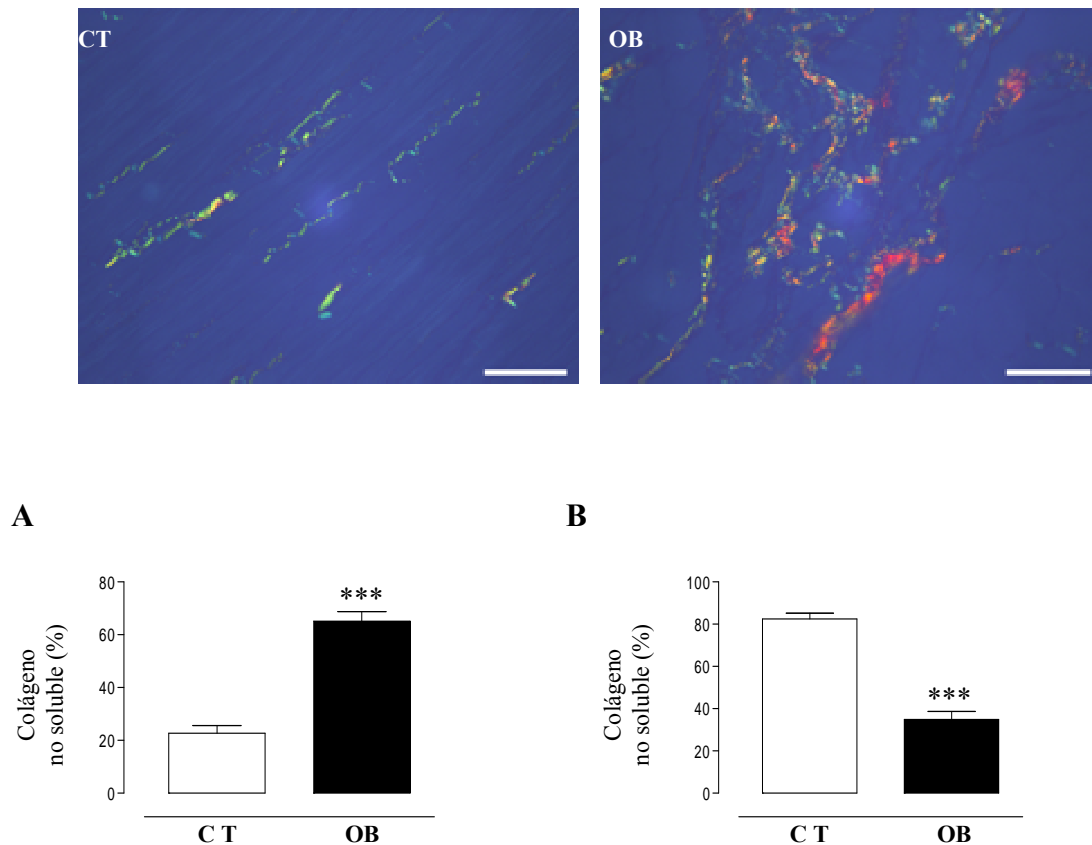


Figura 26: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre los niveles de colágeno no soluble (A) y de colágeno soluble (B) en el corazón de ratas. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con Rojo Sirio e iluminados con luz polarizada. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μ m. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas por porcentaje de área teñida (***) $p < 0.001$ vs. CT).

Este proceso fibrótico observado en los animales que recibieron la dieta con alto contenido en grasa, parece ser debido en parte a un incremento en la síntesis de colágeno tipo I (* $p < 0.05$) (Figura 27A), junto con un descenso en la degradación del mismo. Esto es debido a que el grupo de animales OB mostró una disminución en los niveles proteicos de MMP-2 (* $p < 0.05$), sin observarse cambios en uno de sus inhibidores como es el TIMP-1 (Figura 27B), sugiriendo una menor actividad, y por tanto una menor degradación de colágeno en comparación con el grupo CT.

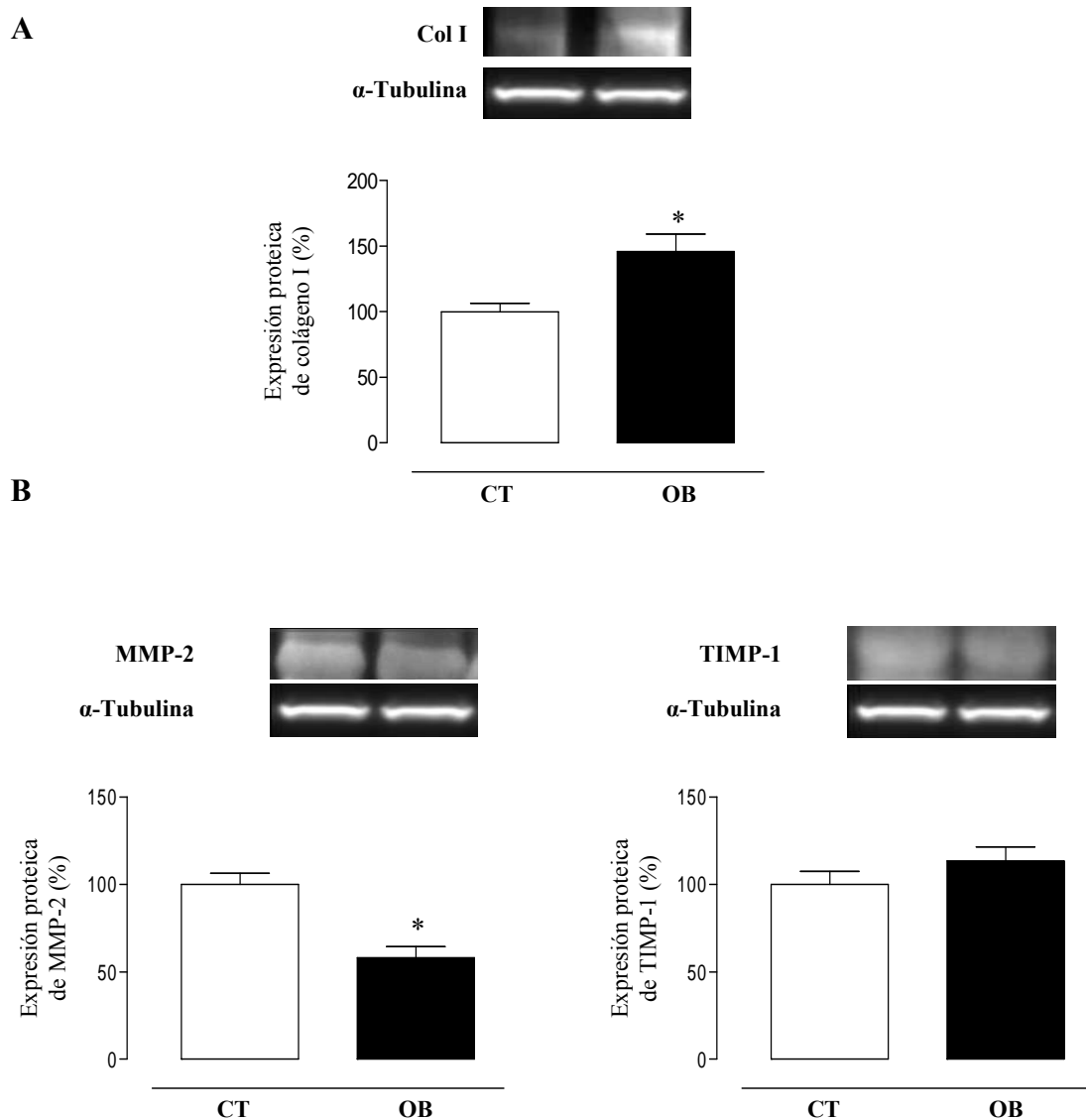


Figura 27: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la producción de colágeno tipo I (A), de MMP-2 y TIMP-1 (B) en el corazón de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7), expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por la α -tubulina (* $p < 0.05$ vs. CT).

Observado el efecto de una dieta rica en grasa sobre la producción y degradación de colágeno tipo I, estudiamos la implicación sobre la producción de colágeno de diferentes mediadores profibróticos como la galectina-3, el TGF- β y el CTGF. La dieta con alto contenido en grasa generó un incremento en los niveles proteicos tanto de galectina-3 y TGF- β (* p <0.05) sin modificaciones en los niveles de CTGF total en el corazón de las ratas (Figura 28).

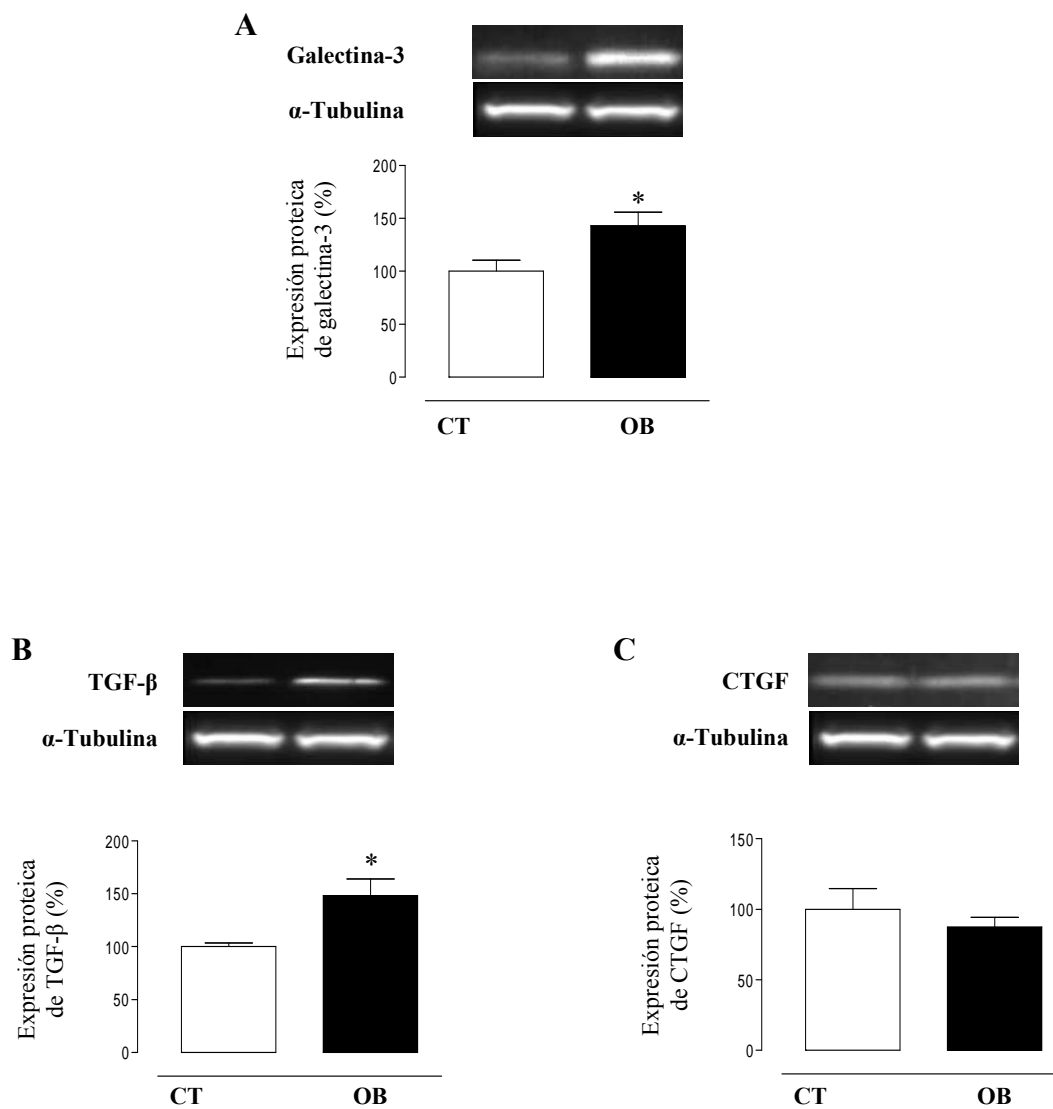


Figura 28: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la producción de (A) galectina-3, (B) TGF- β y (C) CTGF en el corazón de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por la α -tubulina (* p <0.05 vs. CT).

II.2.3. Efectos sobre la producción cardiaca de aniones superóxido $O_2^{\cdot-}$.

Con el fin de estudiar la producción de $O_2^{\cdot-}$, se analizó la intensidad de fluorescencia roja en cortes histológicos incubados con DHE. El DHE ha demostrado que se oxida por la acción del $O_2^{\cdot-}$ produciendo etidio acumulado en el núcleo que tiñe el ADN.

En el corazón de los animales alimentados con la dieta con alto contenido en grasa se observó un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (* $p < 0.05$) (Figura 29).

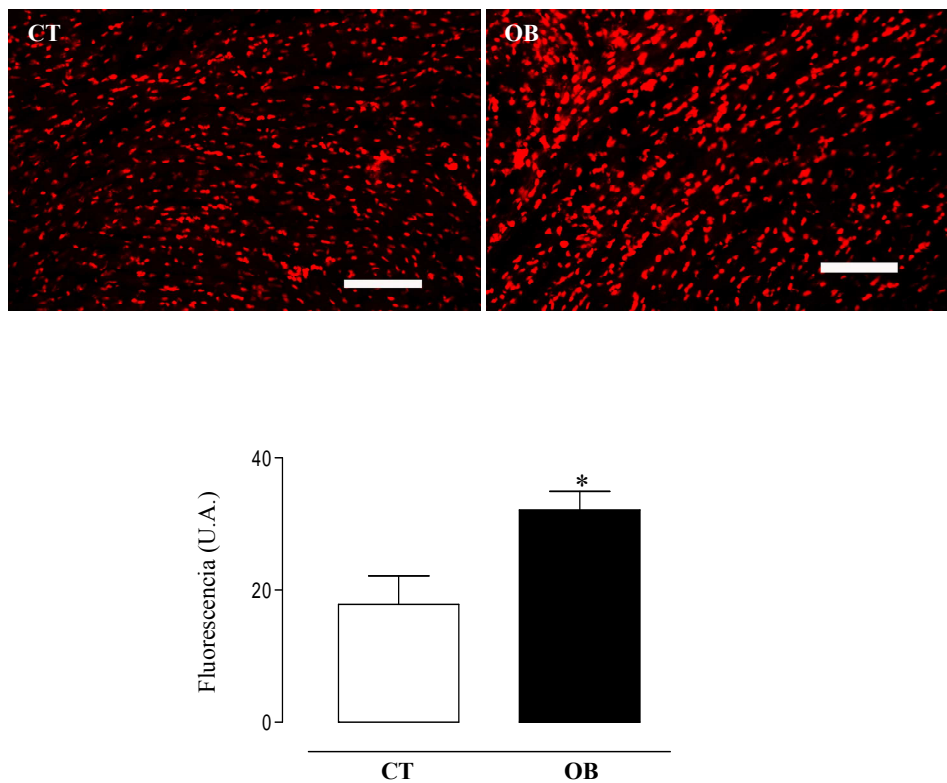


Figura 29: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ en el corazón de ratas. Microfotografías representativas de cortes histológicos de corazón de ratas incubados con DHE. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μ m. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresados en unidades arbitrarias (* $p < 0.05$ vs. CT).

II.2.4. Efectos sobre la vía PI3K/Akt/mTOR.

Con objeto de valorar la posible activación de la vía PI3K/Akt/mTOR se midió la fosforilación de Akt, además de un intermediario de mTOR como es el P70. Los resultados se expresaron como el cociente de la proteína fosforilada con respecto a la proteína no fosforilada, normalizados previamente con su control interno de β -actina.

No se encontraron diferencias en la fosforilación de Akt, ni en la de P70 (Figura 30) entre ambos grupos de animales.

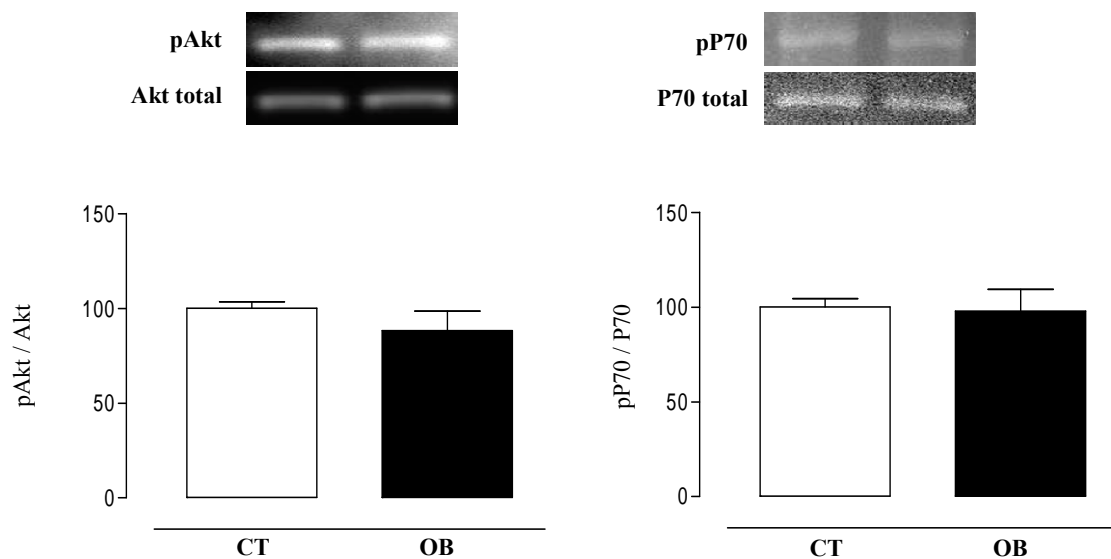


Figura 30: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la fosforilación de Akt (A) y de P70 (B) en el corazón de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por la Akt total y la P70 total respectivamente.

II.2.5. Efectos sobre los niveles cardiacos de leptina y adiponectina.

Exploramos posibles mediadores implicados en el proceso fibrótico y oxidante observado en el corazón de los animales alimentados con la dieta con alto contenido en grasa. Estudiamos si el incremento en el peso corporal del grupo OB era capaz de afectar los niveles cardiacos de distintas adipoquinas como son la leptina y la adiponectina.

En el corazón de los animales alimentados con la dieta con alto contenido en grasa observamos un incremento en los niveles proteicos de leptina (* $p < 0.05$), sin encontrar ningún cambio en los niveles proteicos de adiponectina (Figura 31).

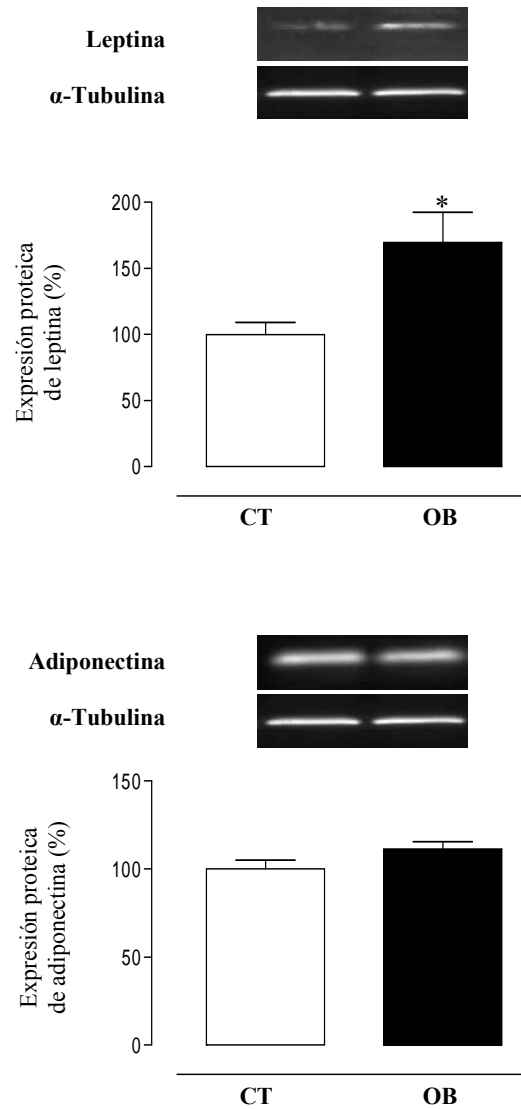


Figura 31: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la producción leptina y adiponectina en el corazón de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por la α -tubulina (* $p < 0.05$ vs. CT).

II.2.6. Asociaciones encontradas entre los niveles cardiacos de leptina y mediadores fibróticos en el corazón.

Al observar el incremento en los niveles de leptina junto con el proceso fibrótico que ocurre en el corazón de los animales que recibieron la dieta con alto contenido en grasa, quisimos comprobar si existía alguna asociación entre dichos valores.

Se observó que existe una correlación entre los niveles cardiacos de leptina y el contenido de colágeno total ($r^2=0.7488$; $p=0.0001$), los niveles proteicos de colágeno tipo I ($r^2=0.4084$; $p=0.0467$), MMP-2 ($r^2=0.4295$; $p=0.0397$), y TGF- β ($r^2=0.4217$; $p=0.0306$) (Figura 32), indicando como la leptina podría estar participando en la fibrosis observada en el corazón de los animales OB.

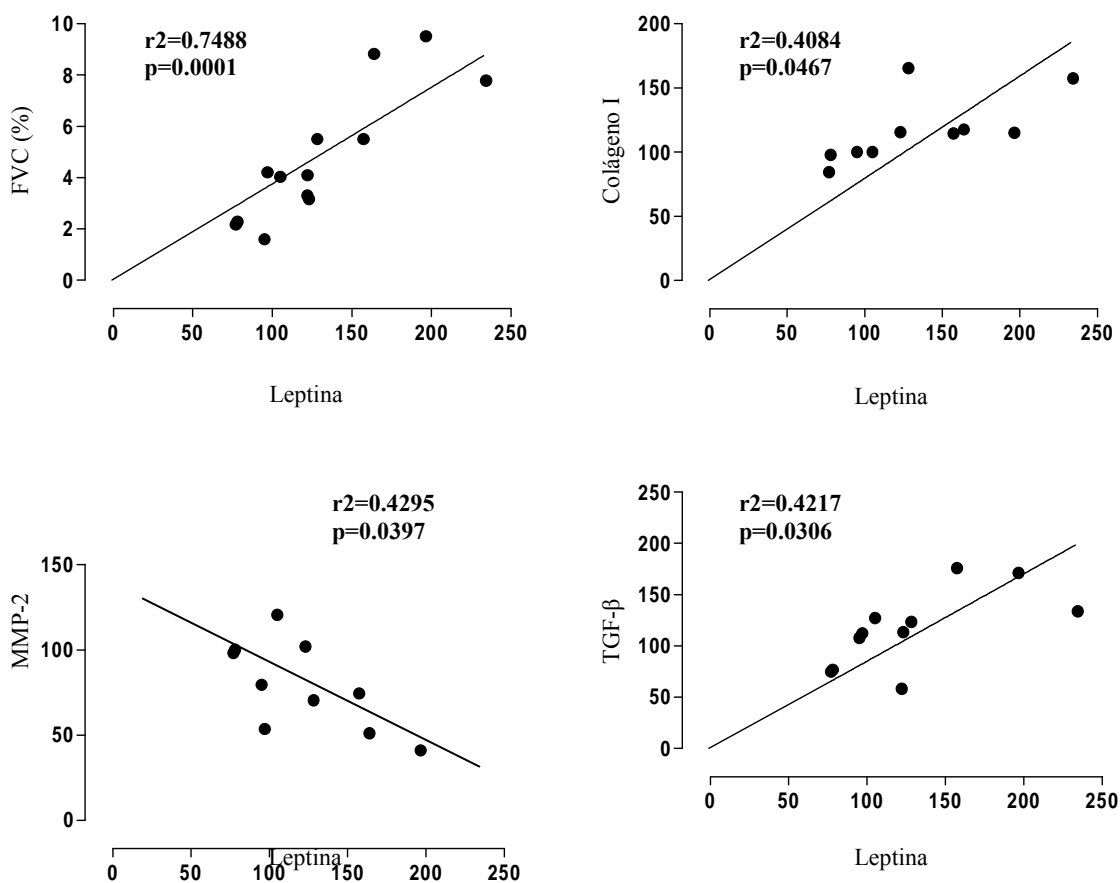


Figura 32: Análisis de regresión lineal demostrando una relación positiva entre los niveles cardiacos de leptina y el contenido de colágeno, los niveles proteicos de colágeno tipo I y TGF- β . Asimismo, observamos una relación negativa entre los niveles cardiacos de leptina y los niveles proteicos de MMP-2.

Nuestros datos muestran como en el corazón de ratas obesas se produce un proceso fibrótico como consecuencia de un aumento de los niveles de colágeno y un proceso oxidante como consecuencia de un aumento en la presencia de aniones superóxido que son previos al desarrollo de cambios en la función cardíaca.

Estos cambios en los niveles de colágeno, parecen ser debidos a incrementos en la síntesis de colágeno tipo I y una disminución en la degradación del mismo.

A su vez, esos cambios en la síntesis de colágeno tipo I parecen ser debidos a incrementos en distintos mediadores profibróticos como son el TGF- β y la galectina-3.

Debido al incremento en los niveles cardíacos de leptina, y a la correlación que existe entre la leptina y los niveles de colágeno total, colágeno tipo I, MMP-2 y TGF- β , nuestros datos muestran como la leptina, producida localmente en el corazón, podría participar en estos cambios producidos en el miocardio, mediante un incremento en la producción de colágeno junto con una menor degradación del mismo, mostrando a esta adipoquina como una posible diana terapéutica.

II.2.7. Efectos de la leptina sobre cardioblastos de rata adulta.

a) Caracterización de la estirpe celular en cardioblastos de rata adulta.

La caracterización de las células revela la expresión mediante inmunocitoquímica de vimentina (Figura 33A) y de α -actina de músculo esquelético (Figura 33B). La coexpresión de ambos antígenos (Figura 33C) se puede observar desde el primer pase del cultivo, lo que indica que las células poseen un fenotipo de miofibroblastos.

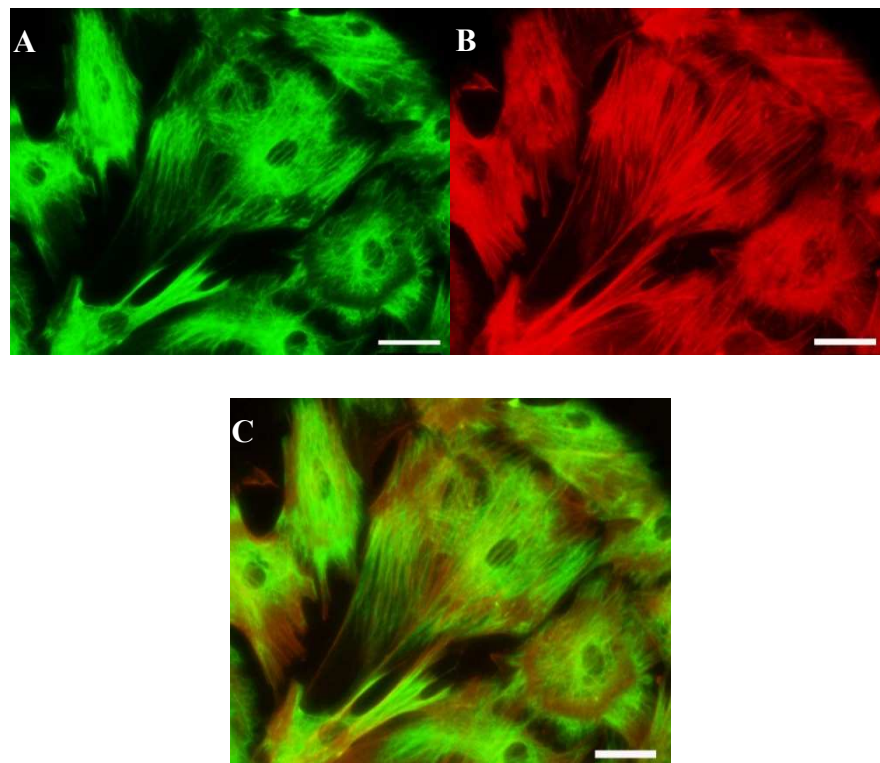


Figura 33: Imágenes representativas de inmunocitoquímica de cardiomioblastos procedentes de rata adulta sometidas a ensayos de inmunofluorescencia con marcaje para vimentina (A), con α -actina de músculo esquelético (B), fusión (C). Aumento 40X. Barra de escala 50 μ m.

b) Efectos de la leptina sobre la matriz extracelular en cardiomioblastos.

La estimulación con leptina incrementó la producción de colágeno tipo I en cardiomioblastos de rata adulta de manera concentración y tiempo dependiente (Figura 34A y 34B respectivamente) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), observándose un máximo de producción de colágeno tipo I a las 24 horas de estimulación y a la concentración de leptina de 100 ng/ml. Para los estudios posteriores, se seleccionó la concentración de leptina de 100 ng/ml, niveles que se pueden encontrar en individuos obesos.

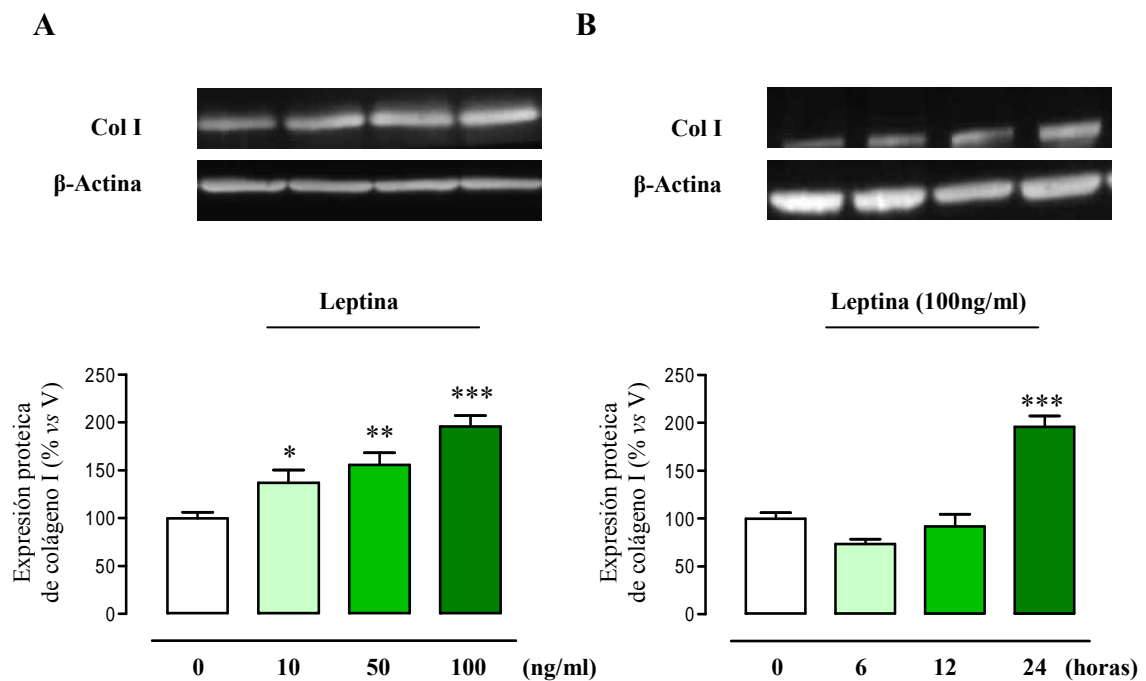


Figura 34: Efecto de leptina a diferentes concentraciones (24 horas de estimulación) (A) y a diferentes tiempos (B) sobre la producción de colágeno tipo I en cardiomioblastos de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. vehículo).

La leptina generó un descenso en la actividad de proteínas que degradan la matriz extracelular como es la MMP-2 en los cardiomiocitos de rata adulta tras 24 horas de estimulación con leptina, independientemente de la concentración de leptina empleada (* $p < 0.05$). (Figura 35).

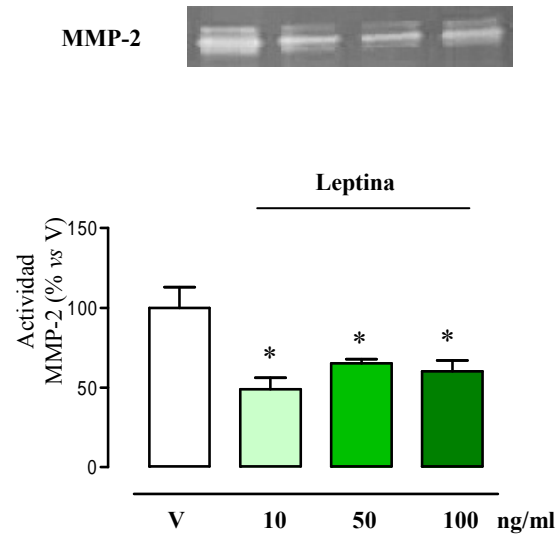


Figura 35: Efecto de leptina a diferentes concentraciones sobre la actividad de MMP-2 en cardiomiocitos de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (* $p < 0.05$ vs. vehículo).

Se valoró la implicación de diferentes mediadores profibróticos como la galectina-3, el TGF- β y el CTGF tanto total como el dominio N-terminal del mismo (implicado en el efecto profibrótico del CTGF), a diferentes tiempos empleando la concentración de leptina de 100 ng/ml. La leptina generó un incremento en los niveles proteicos de galectina-3 y de TGF- β a las 12 horas de estimulación (** $p < 0.01$) (Figura 36A y 36B), mientras que mostró un incremento de CTGF tanto total como del dominio N-terminal a las 24 horas de estimulación (** $p < 0.01$) (Figura 36C y 36D).

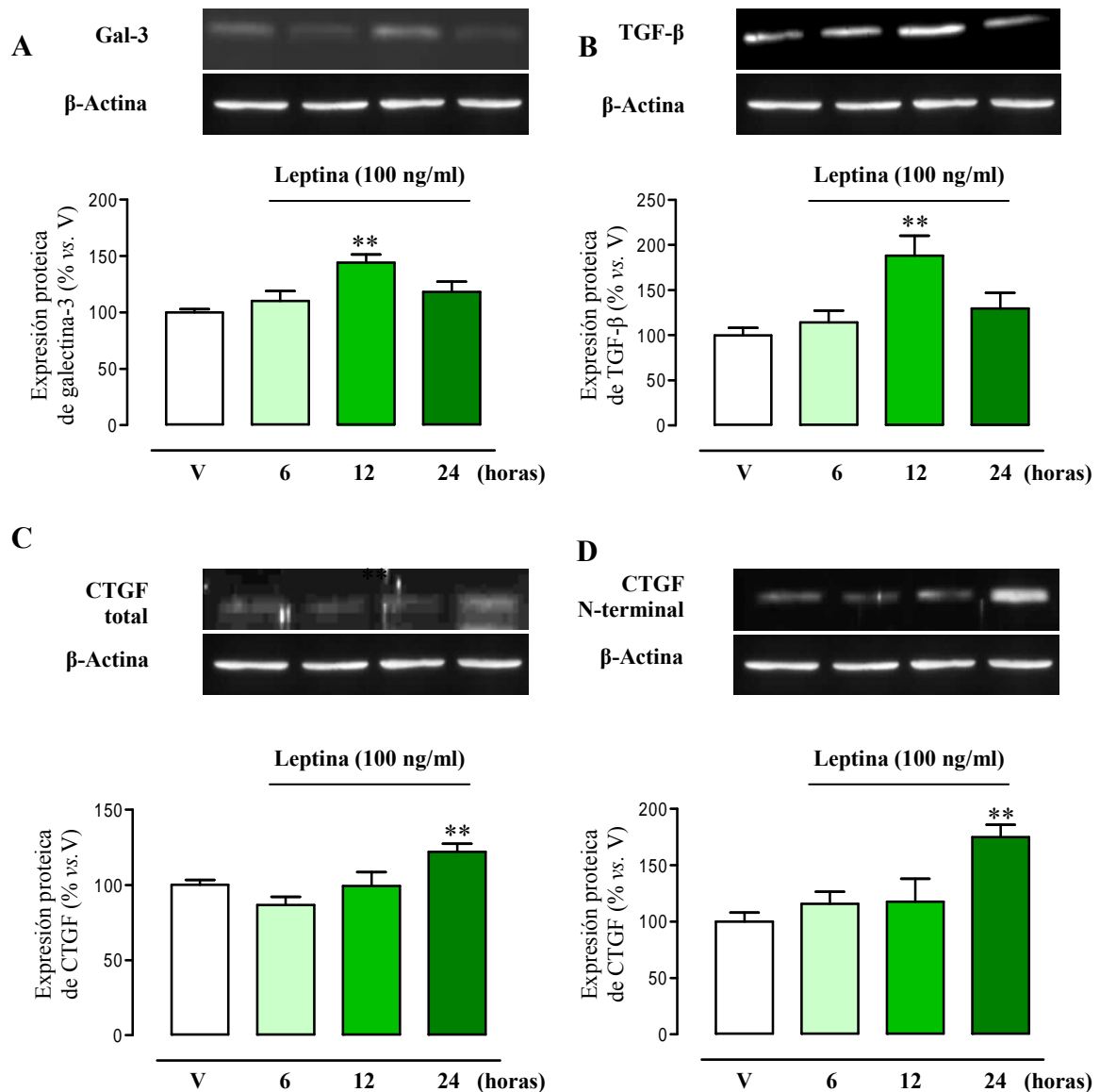


Figura 36: Efecto de leptina (100 ng/ml) a diferentes tiempos sobre la producción proteica de galectina-3 (A), de TGF- β (B), de CTGF total (C) y del dominio N-terminal del CTGF (D) en cardiomioblastos de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (** $p < 0.01$ vs. vehículo).

c) Efectos de la leptina sobre la producción de aniones superóxido $O_2^{\cdot-}$ en cardiomiocitos.

Con el fin de estudiar la producción de $O_2^{\cdot-}$, se analizó la intensidad de fluorescencia roja en células estimuladas con leptina a diferentes concentraciones durante 24 horas utilizando DHE. El DHE ha demostrado que se oxida por la acción del $O_2^{\cdot-}$ produciendo etidio acumulado en el núcleo que tiñe el ADN.

La estimulación con leptina incrementó la producción $O_2^{\cdot-}$ en cardiomiocitos de rata adulta de manera concentración dependiente ($***p<0.001$) observándose un máximo a la dosis de 100 ng/ml (Figura 37A), mostrando el efecto prooxidante de la misma. A dicha dosis, la leptina fue capaz de incrementar la producción de $O_2^{\cdot-}$ incluso a tiempos cortos de estimulación ($*p<0.05$; $***p<0.001$) (Figura 37B).

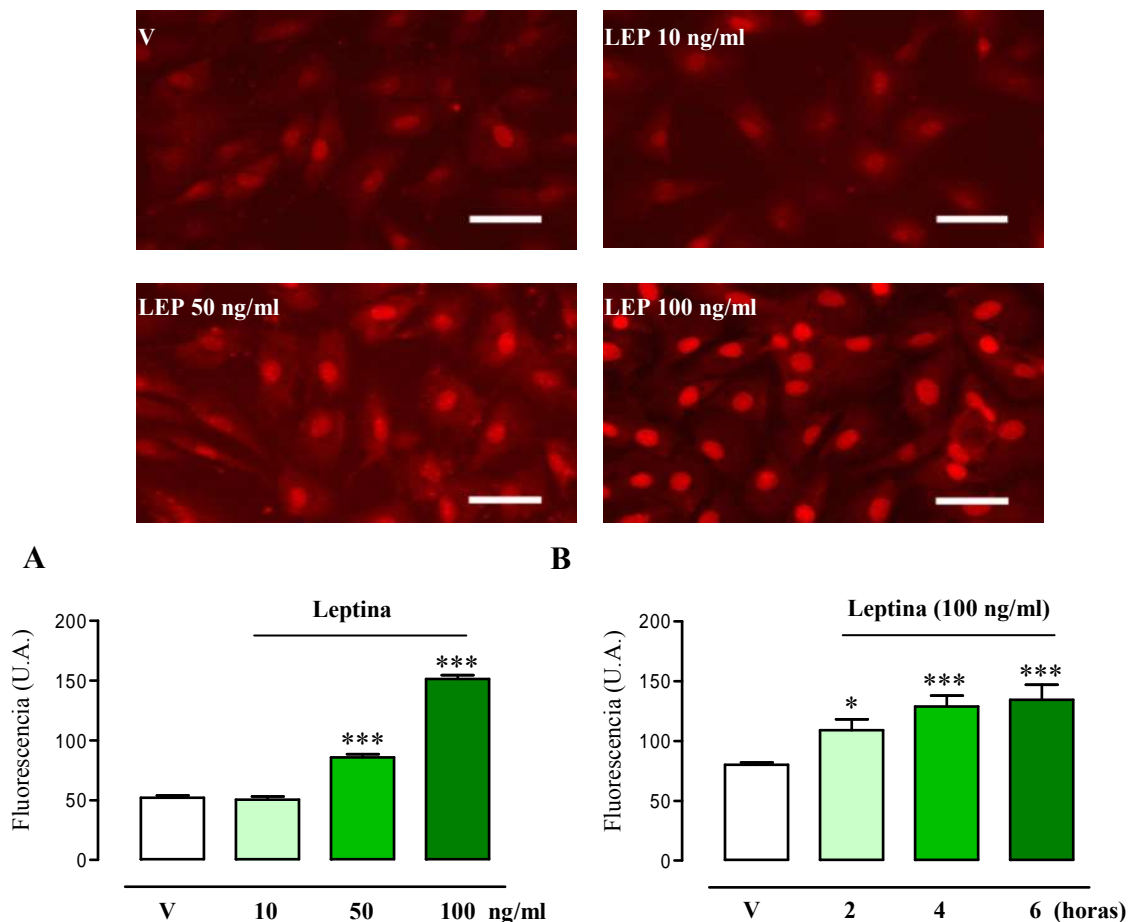


Figura 37: Efecto de leptina a diferentes concentraciones (24 horas de estimulación) (A) y a diferentes tiempos (B) sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ en cardiomiocitos de rata. Microfotografías representativas de cardiomiocitos incubados con DHE con diferentes concentraciones de leptina. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. ($***p<0.001$ vs. vehículo).

d) Influencia del estrés oxidativo sobre los efectos de la leptina en cardiomiocitos.

Con objeto de valorar el posible papel que juega el estrés oxidativo sobre las acciones profibróticas de la leptina en cardiomiocitos de rata, estimulamos las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml durante 24 horas en presencia de un antioxidante general como es la melatonina a la concentración de (10^{-3} mmol/l).

Como era de esperar, la presencia de melatonina, evitó el incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ generado por la leptina ($\dagger\dagger\dagger p < 0.001$) (Figura 38). La melatonina en ausencia de leptina no modificó la producción de $O_2^{\cdot-}$.

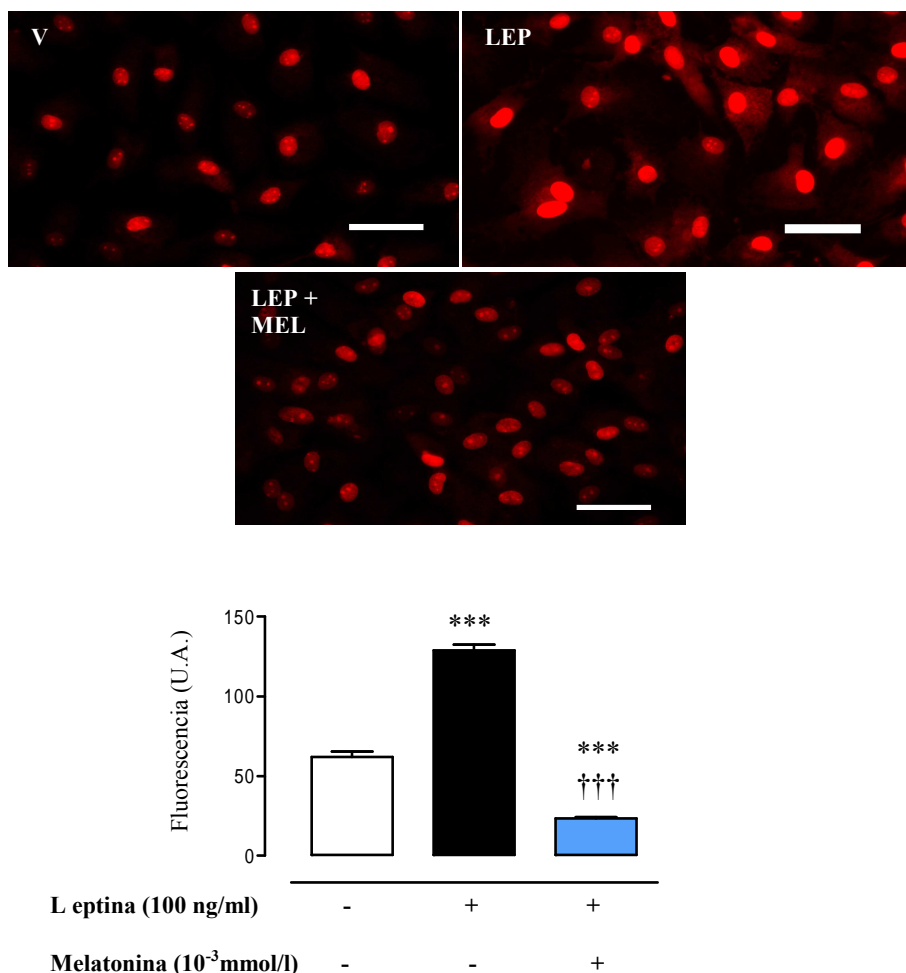


Figura 38: Efecto de melatonina (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por la leptina (100 ng/ml) a las 24 horas de estimulación en cardiomiocitos de rata. Microfotografías representativas de cardiomiocitos incubados con DHE. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (***) $p < 0.001$ vs. vehículo; $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ vs. leptina 100 ng/ml).

Confirmado el efecto antioxidante de la melatonina a la condición usada, estudiamos los efectos generados por la leptina (100 ng/ml) sobre la matriz extracelular en presencia de melatonina (10^{-3} mmol/l) tras 24 horas de estimulación. Comprobamos como la presencia de melatonina, fue capaz de prevenir la síntesis de colágeno tipo I inducida por la leptina ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 39A), mostrando el papel del estrés oxidativo sobre el efecto profibrótico de la leptina. La melatonina en ausencia de leptina no modificó la síntesis de colágeno tipo I.

Por el contrario, la melatonina no fue capaz de prevenir el descenso en la actividad de la MMP-2 generada por la acción de la leptina ($*p < 0.05$) (Figura 39B). La melatonina en ausencia de leptina no modificó la actividad de la MMP-2.

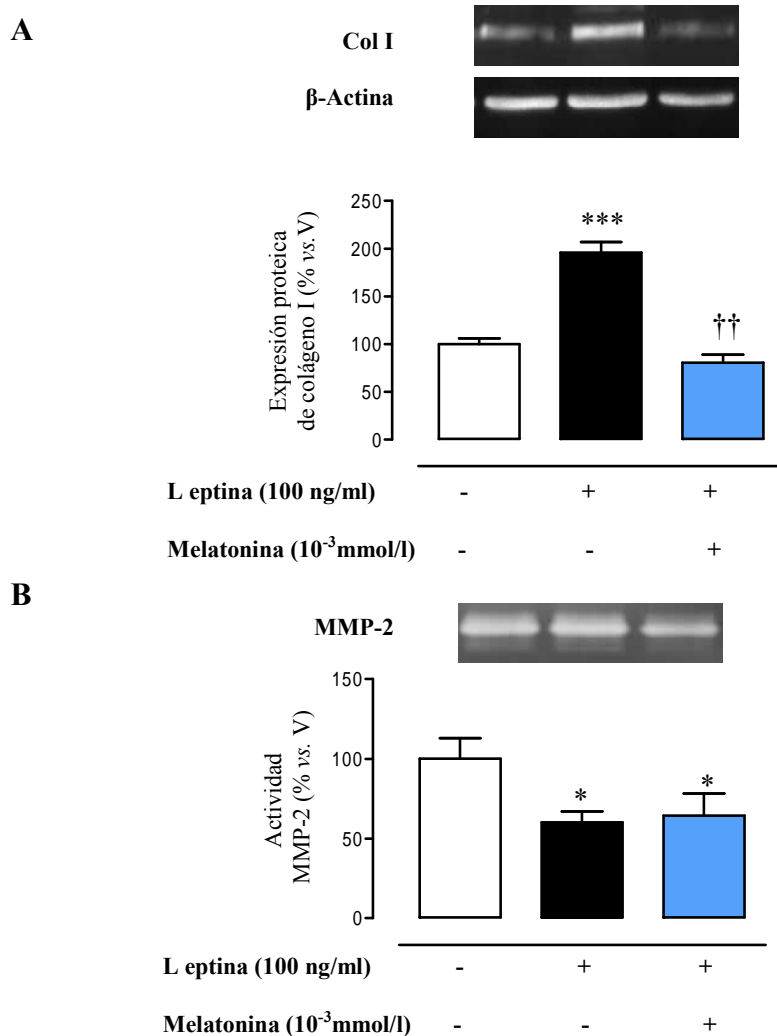
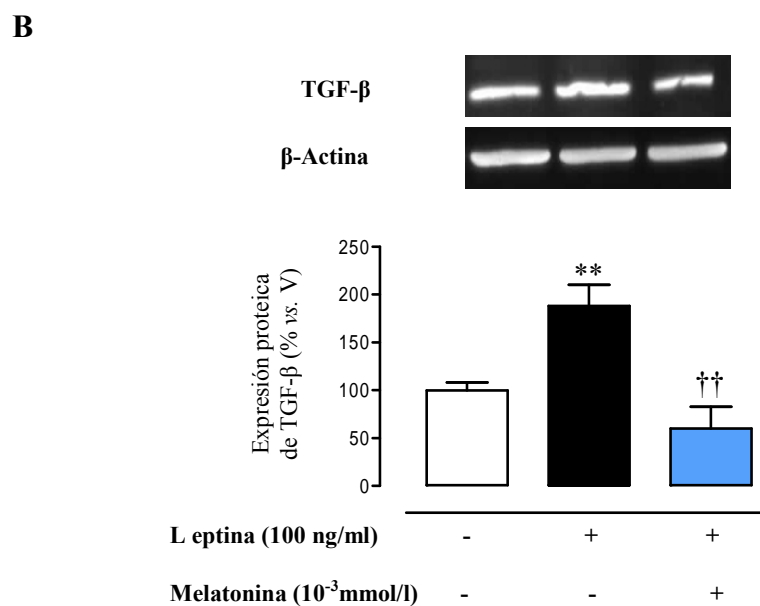
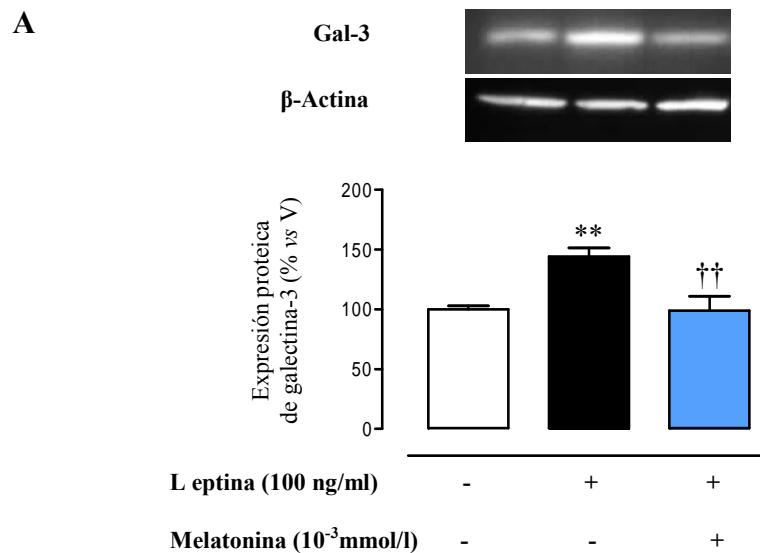


Figura 39: Efecto de melatonina (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de colágeno tipo I inducida por la leptina (100 ng/ml) (A) y sobre la actividad de MMP-2 (B) a las 24 horas de estimulación en cardiomiocitos de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. ($*p < 0.05$; $***p < 0.001$ vs. vehículo; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

Observado el efecto de la melatonina sobre la producción de colágeno tipo I, estudiamos los niveles proteicos de los mediadores profibróticos analizados anteriormente al tiempo en el que se observaba su máxima producción inducida por leptina (100 ng/ml). De este modo observamos como la melatonina fue capaz de prevenir el incremento en los niveles de galectina-3 y de TGF- β a las 12 horas de estimulación ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 40A y 40B).

En el caso de los niveles proteicos de CTGF, la melatonina no fue capaz de prevenir el incremento observado en los niveles de CTGF total (Figura 40C) a las 24 horas de estimulación, pero por el contrario si fue capaz de prevenir los observados en el dominio N-terminal del mismo ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 40D). La melatonina en ausencia de leptina no modificó la síntesis de ninguno de los mediadores estudiados.



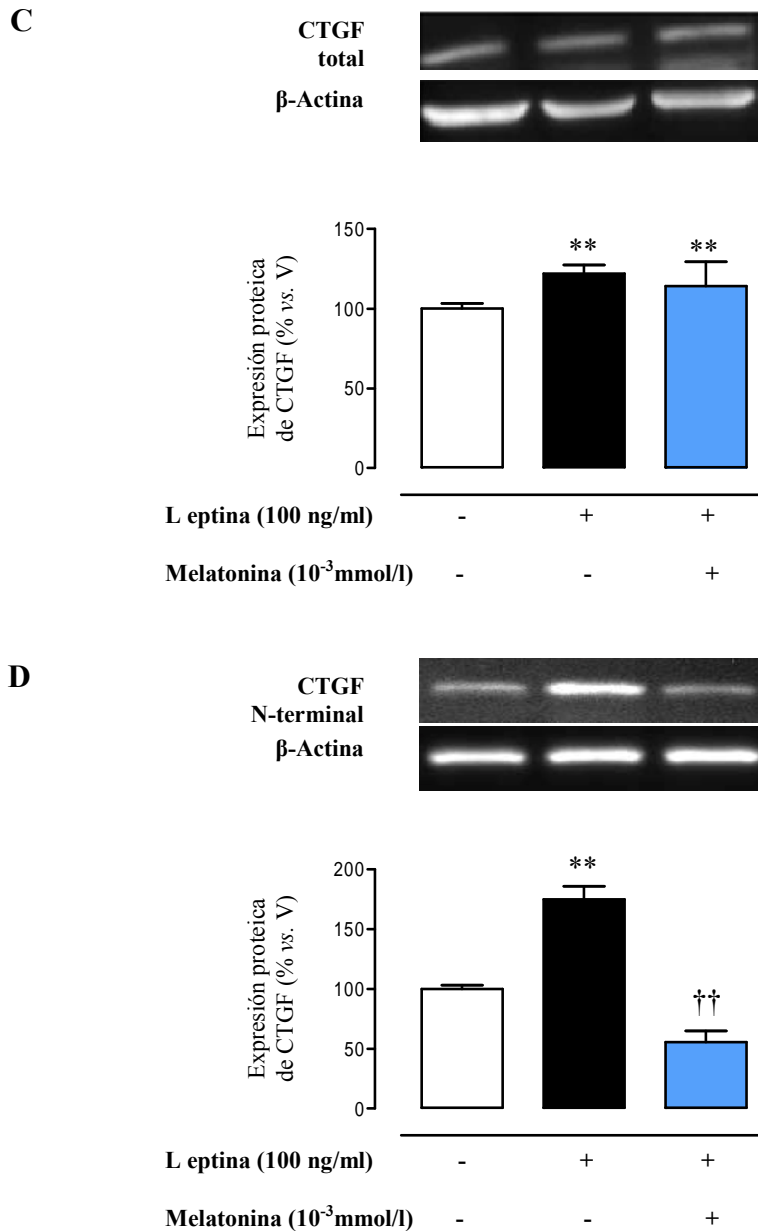


Figura 40: Efecto de melatonina (10⁻³ mmol/l) sobre los niveles de galectina-3 (A), de TGF-β (B), de CTGF total (C) y del dominio N-terminal del CTGF (D) inducida por leptina (100 ng/ml) en cardiomiocitos de rata. Las barras representan la media±EEM de 4 experimentos distintos. (**p<0.01 vs. control; ††p<0.01 vs. leptina 100 ng/ml).

e) Influencia de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre los efectos de la leptina en cardiomiocitos.

Con objeto de valorar la posible activación de la vía PI-3K/Akt/mTOR se midió la fosforilación de Akt, además de un intermediario de mTOR como es el P70. Los

resultados se expresaron como el cociente de la proteína fosforilada con respecto a la proteína no fosforilada, normalizados previamente con su control interno de β -actina.

La leptina generó una activación/fosforilación de p70, observándose un máximo a los 60 minutos de estimulación de las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) (Figura 41A), además de encontrar un incremento en la fosforilación de Akt a las 24 horas de estimulación con leptina a la concentración de 100 ng/ml (** $p < 0.01$) (Figura 41B).

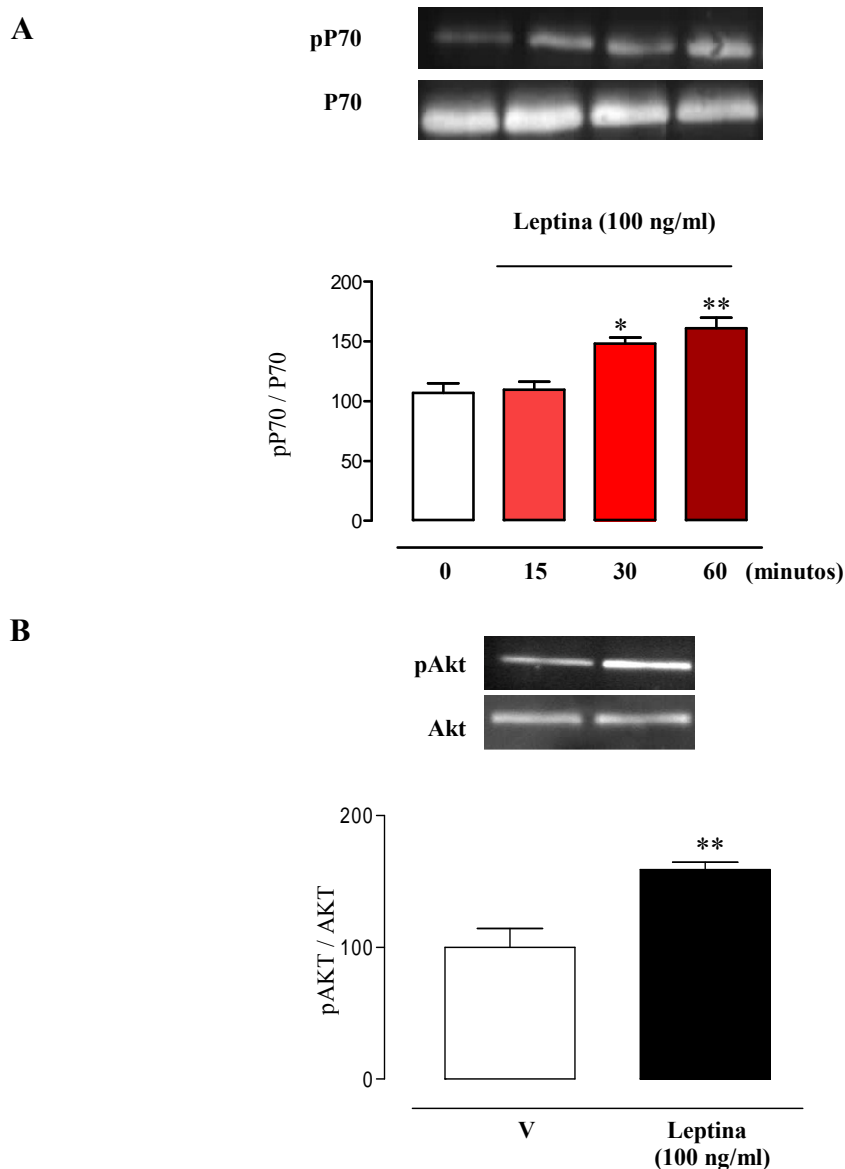


Figura 41: Efecto de la leptina 100 ng/ml sobre la fosforilación de P70 (A) y de Akt (A) en el cardiomioblastos de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por la Akt total y la P70 total respectivamente. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. vehículo).

Observada la activación de la vía mTOR por acción de la leptina valoramos la implicación que tiene dicha vía sobre el estrés oxidativo inducido por la leptina en cardiomioblastos de rata adulta. Estimulamos las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml durante 24 horas en presencia del inhibidor de la vía mTOR, la rapamicina (10^{-4} mmol/L).

La presencia de rapamicina, previno el incremento en la producción de O_2^- generado por la leptina ($\dagger\dagger\dagger p < 0.001$) (Figura 42). La rapamicina en ausencia de leptina no modificó la producción de O_2^- .

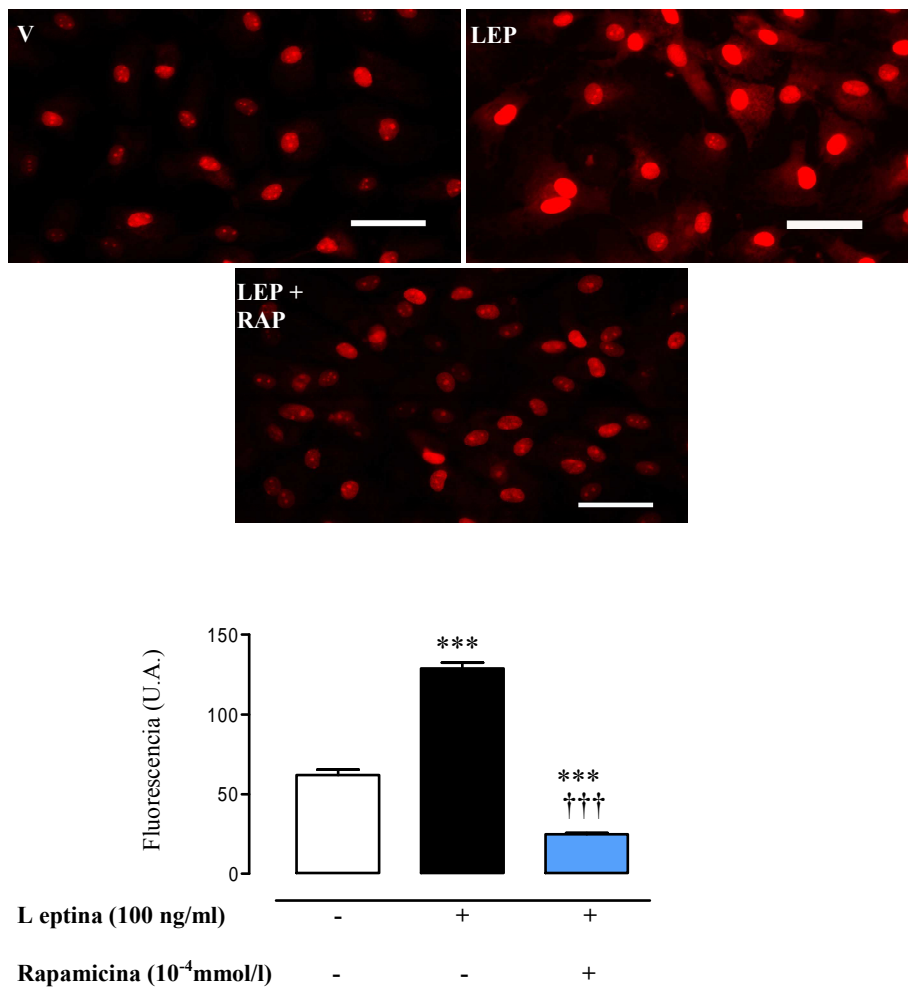


Figura 42: Efecto de rapamicina (10^{-4} mmol/l) sobre la producción de O_2^- inducida por la leptina (100 ng/ml) a las 24 horas de estimulación en cardiomioblastos de rata. Microfotografías representativas de cardiomioblastos incubados con DHE. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (***) $p < 0.001$ vs. vehículo; ($\dagger\dagger\dagger$) $p < 0.001$ vs. leptina 100 ng/ml).

Comprobado el efecto de la vía mTOR sobre la acción prooxidante de la leptina, estudiamos la posible implicación de dicha vía sobre los efectos de la producción de colágeno tipo I ejercidos por la leptina. La presencia de rapamicina fue capaz de prevenir la síntesis de colágeno tipo I inducida por la leptina (100 ng/ml) ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 43A), sugiriendo el papel de la vía mTOR sobre el efecto profibrótico de la leptina. La rapamicina en ausencia de leptina no modificó la síntesis de colágeno tipo I.

Por el contrario, la rapamicina no fue capaz de prevenir el descenso en la actividad de la MMP-2 generada por la acción de la leptina (Figura 43B). La rapamicina en ausencia de leptina no modificó la actividad de la MMP-2.

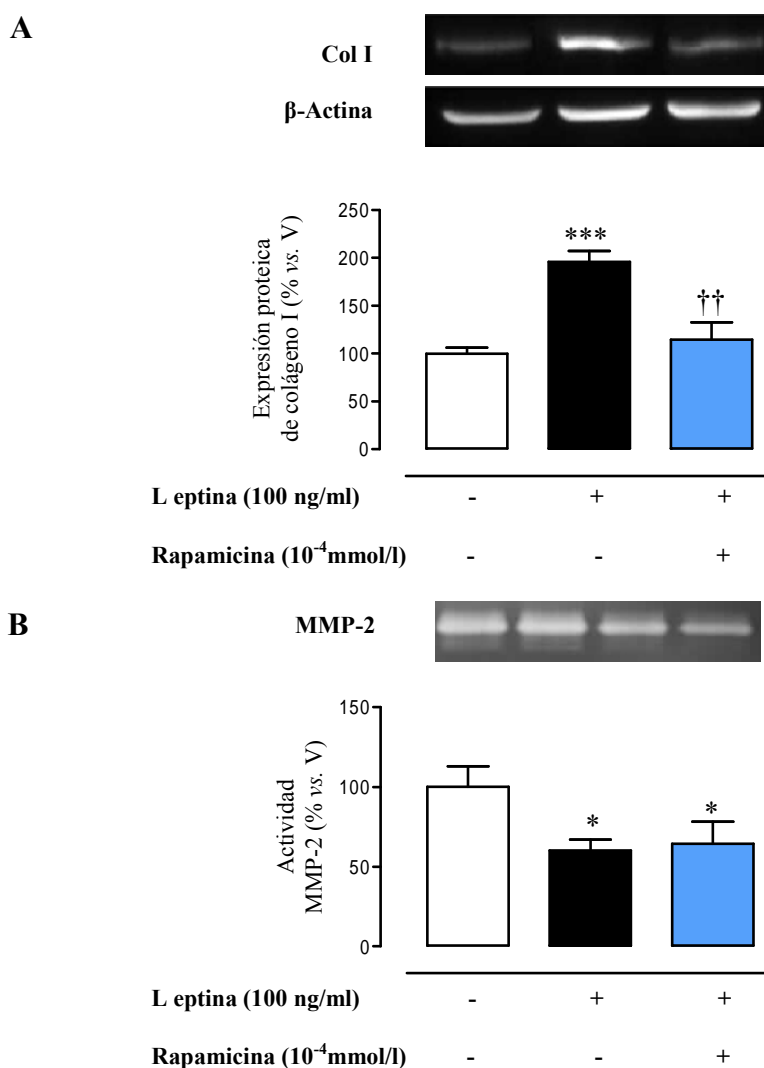
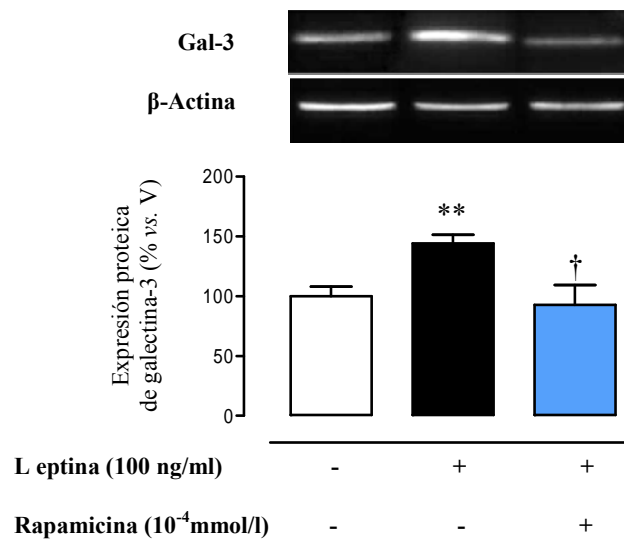


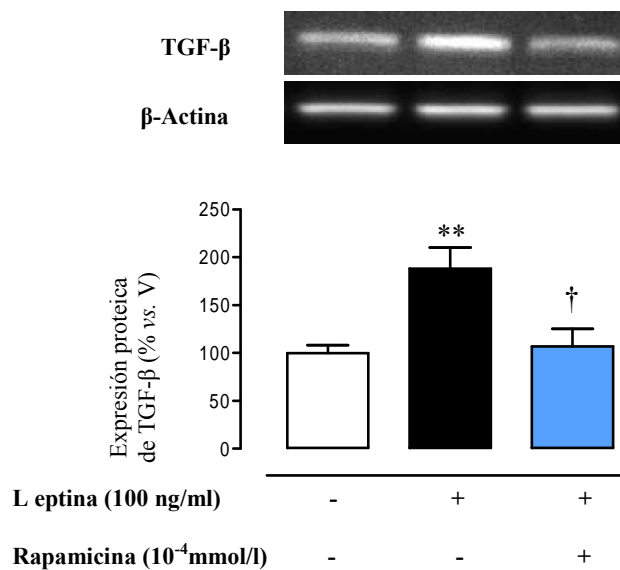
Figura 43: Efecto de rapamicina (10^{-4} mmol/l) sobre la producción de colágeno tipo I inducida por la leptina (100 ng/ml) (A), sobre la actividad de MMP-2 (B) a las 24 horas de estimulación en cardiomiocitos de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. vehículo; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

La presencia de rapamicina en el medio de cultivo fue capaz de prevenir el incremento en los niveles de galectina-3 y de TGF- β a las 12 horas de estimulación ($\dagger p < 0.05$) (Figura 44A y 44B). En el caso de los niveles proteicos de CTGF, la rapamicina previno el incremento observado en los niveles de CTGF total y el dominio N-terminal del mismo a las 24 horas de estimulación ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 44C y 44D). La rapamicina en ausencia de leptina no modificó la síntesis de ninguno de los mediadores estudiados.

A



B



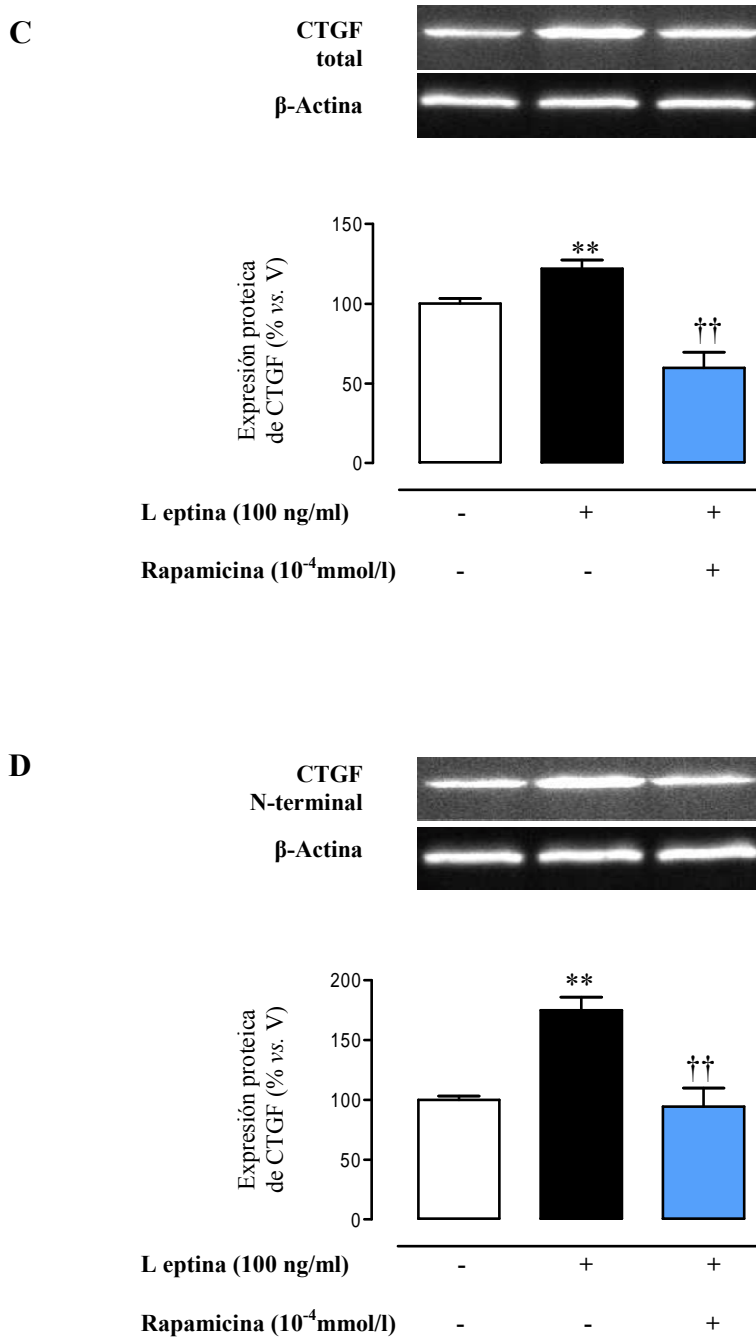


Figura 44: Efecto de rapamicina (10^{-4} mmol/l) sobre la producción de galectina-3 (A), de TGF- β (B), de CTGF total (C) y del dominio N-terminal del CTGF (D) inducida por la leptina (100 ng/ml) en cardiomiocitos de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (** $p < 0.01$ vs. vehículo; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

f) Papel de la galectina-3 sobre los efectos de la leptina en cardiomioblastos.

Con objeto de valorar la implicación que tiene galectina-3 sobre las acciones de la leptina en cardiomioblastos de rata adulta, estimulamos las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml durante 24 horas en presencia de un inhibidor de la actividad de la galectina-3, el N-acetilglucosamina (LacNac, 10^{-3} mmol/L).

La presencia de LacNac previno parcialmente el incremento en la producción de O_2^- generado por la leptina, aunque no fue capaz de normalizar dichos niveles ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 45). El LacNac en ausencia de leptina no modificó la producción de O_2^- .

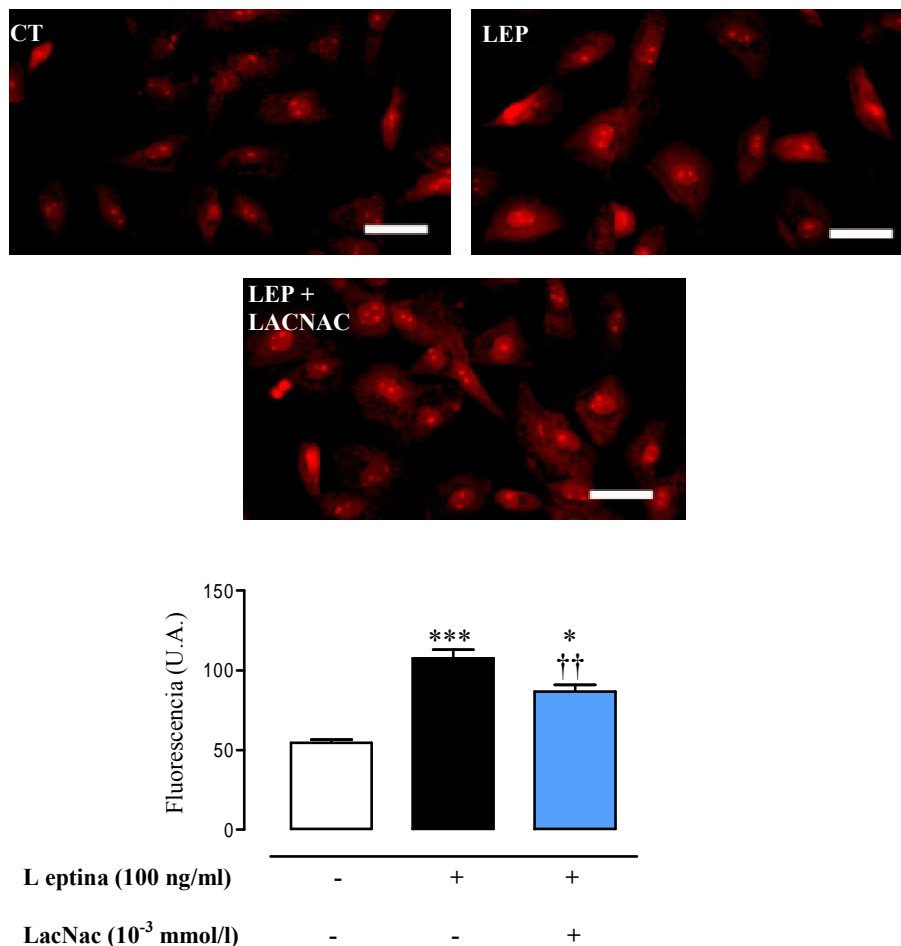


Figura 45: Efecto de LacNac (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de O_2^- inducida por la leptina (100 ng/ml) a las 24 horas de estimulación en cardiomioblastos de rata. Microfotografías representativas de cardiomioblastos incubados con DHE. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs. vehículo; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

Valorado el efecto de la galectina-3 sobre la acción prooxidante de la leptina, estudiamos su posible implicación sobre los efectos de la producción de colágeno tipo I ejercidos por la leptina. Comprobamos como la presencia de LacNac es capaz de prevenir la síntesis de colágeno tipo I inducida por la leptina (100 ng/ml) ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 46A), sugiriendo el papel de galectina-3 sobre el efecto profibrótico de la leptina. El LacNac en ausencia de leptina no modificó la síntesis de colágeno tipo I.

Por el contrario, el LacNac no fue capaz de prevenir el descenso en la actividad de la MMP-2 generada por la acción de la leptina ($*p < 0.05$) (Figura 46B). El LacNac en ausencia de leptina no modificó la actividad de la MMP-2.

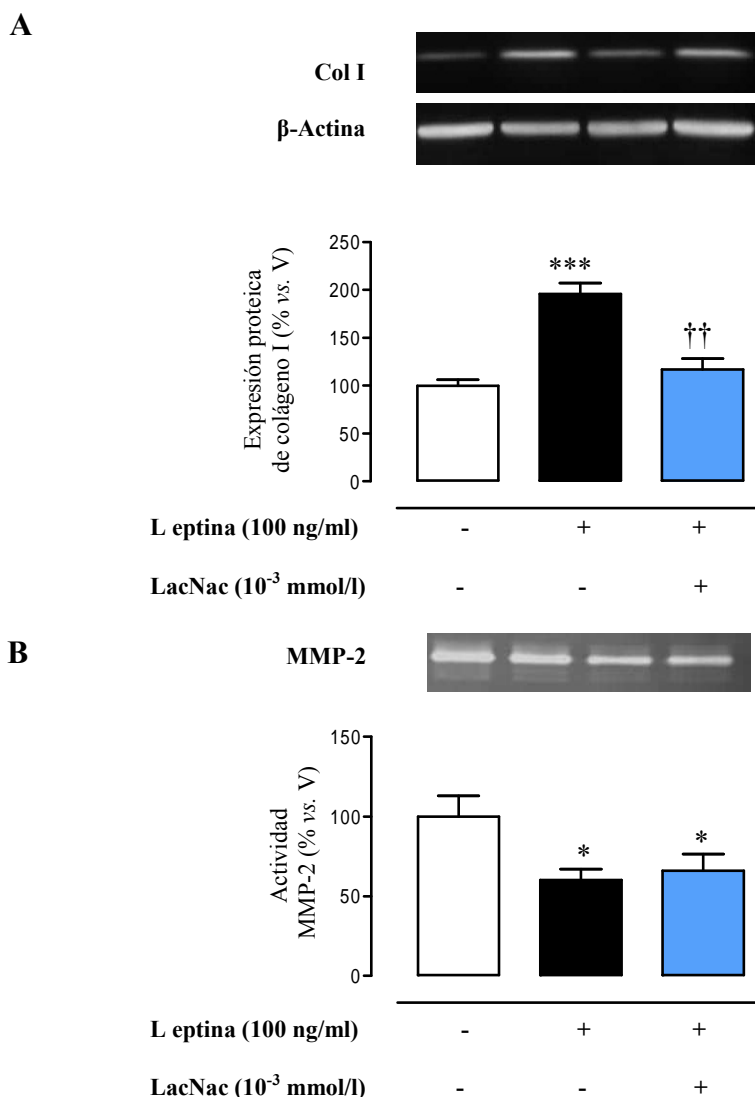


Figura 46: Efecto de LacNac (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de colágeno tipo I generada con leptina (100 ng/ml) (A), sobre la actividad de MMP-2 (B) a las 24 horas de estimulación en cardiomiocitos de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. ($*p < 0.05$; $***p < 0.001$ vs. vehículo; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

Los datos sugieren que la leptina es un factor prooxidante y profibrótico en cardiomioblastos procedentes de rata adulta ya que la leptina es capaz de incrementar tanto la producción de aniones superóxido como de colágeno tipo I.

El efecto prooxidante de la leptina parece mediar el efecto profibrótico de la misma, ya que el empleo de un antioxidante como la melatonina, es capaz de prevenir la producción de colágeno tipo I inducida por la leptina. Asimismo, la melatonina reduce los niveles de mediadores profibróticos que se encuentran incrementados por la acción de la leptina como son la galectina-3, el TGF- β y el CTGF.

La producción de aniones superóxido, parece ser debida en parte, por la activación de la vía mTOR ya que la inhibición de dicha vía genera una reducción en el incremento observado en las células estimuladas con leptina tanto de colágeno tipo I, como de los distintos mediadores profibróticos como son el TGF- β , la galectina-3 y el CTGF.

Por otra parte, nuestros datos sugieren la participación de la galectina-3 en el efecto fibrótico inducido por la leptina. Esta afirmación se basa en dos observaciones: Primero, la leptina produce un incremento paralelo en los niveles tanto de colágeno tipo I como de galectina-3 en los cardiomioblastos; y en segundo lugar, la inhibición de la actividad de la galectina-3 produce una reducción en el incremento observado en los niveles de colágeno tipo I inducido por la leptina.

II.3. Efectos de la obesidad inducida por dieta sobre la aorta en rata adulta.

II.3.1. Efectos sobre la función y la morfometría de la aorta.

En los estudios de función vascular, no se encontraron diferencias en la relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (ACh) (Figura 47). Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias ni en la respuesta a factores vasodilatadores independientes de endotelio como el Nitroprusiato Sódico ni en la respuesta a un agonista de los receptores α_1 -adrenérgicos como es la fenilefrina, entre ambos grupos de ratas.

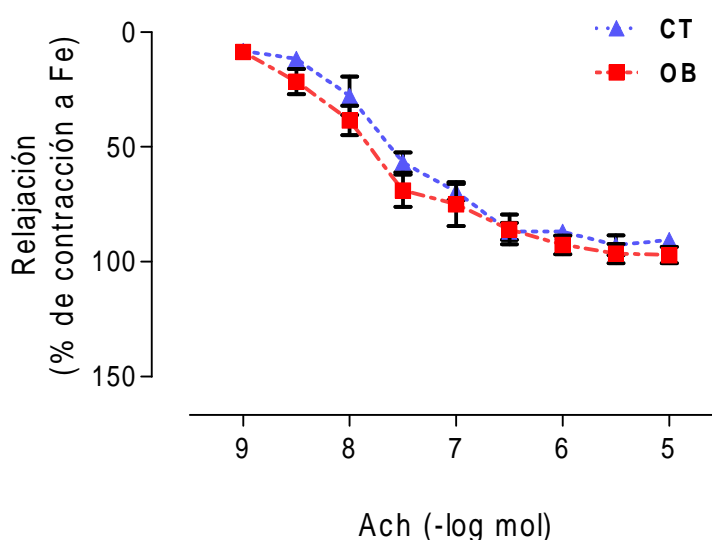


Figura 47: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la relajación mediada por acetilcolina en anillos aórticos de ratas. Los datos representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7).

En el grupo de animales que recibió la dieta con alto contenido en grasa observamos un incremento en el área de la media (** $p < 0.01$) de los animales obesos, sin modificación de manera significativa en el área de la luz, generando por tanto un incremento en el ratio media/lumen (** $p < 0.01$ vs. CT). Por el contrario, observamos un ligero cambio, pero que no llega a ser significativo en el área del vaso comparado con el grupo CT (Tabla 18).

	CT	OB
Área vaso (mm ²)	1.93±0.08	2.0±0.08
Área lumen (mm ²)	1.53±0.07	1.44±0.05
Área media (mm ²)	0.42±0.01	0.51±0.01**
Ratio media/lumen	0.28±0.01	0.33±0.008**
Grosor de la media (µm)	96.6±1.07	115.4±5.1**

Tabla 18: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la morfometría de la aorta en rata. Los datos representan la media±EEM de cada grupo (n=7) (**p<0.01 vs. CT).

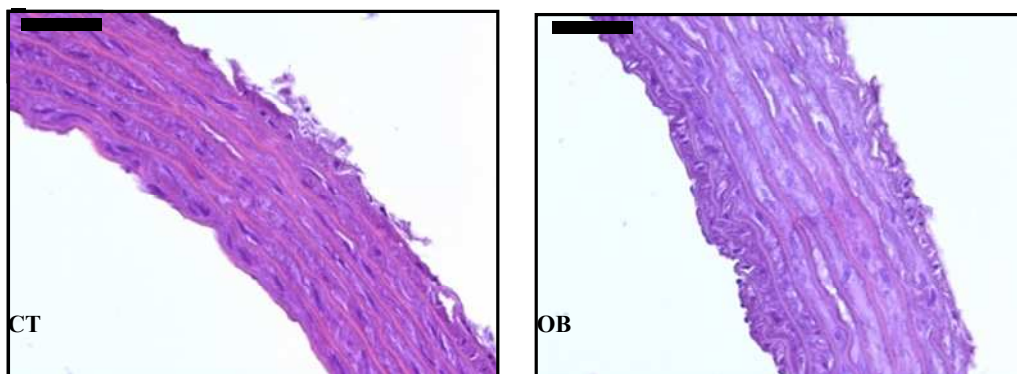


Figura 48: Microfotografías representativas de aortas teñidas con hematoxilina-eosina en ratas alimentadas con una dieta estándar y en ratas alimentadas con una dieta rica en grasa. Aumento al 40X. Barra de escala 50 µm.

II.3.2. Efectos sobre la fibrosis vascular.

La administración de la dieta con alto contenido en grasa generó cambios importantes en la media de la aorta (Tabla 19). Se observó un incremento tanto en el peso seco de la aorta, como en el contenido de proteínas celulares (*p<0.05), indicando hipertrofia de la media de las aortas. Asimismo, observamos un incremento los niveles de colágeno (**p<0.001) sin cambios en los niveles aórticos de elastina, generando por tanto un incremento en el ratio colágeno/elastina en el grupo OB (**p<0.001).

	CT	OB
Peso seco (mg/cm)	2.01±0.099	2.21±0.059*
Proteínas celulares (mg/cm)	0.180±0.033	0.400±0.172*
Colágeno (% peso seco)	5.11±0.715	10.06±0.671***
Elastina (% peso seco)	56.46±1.646	57.82±1.233
Colágeno / Elastina	0.09±0.033	0.17±0.029***

Tabla 19: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la composición de la pared arterial en ratas. Los datos representan la media±EEM de cada grupo (n=7) (*p<0.05; ***p<0.001 vs. CT).

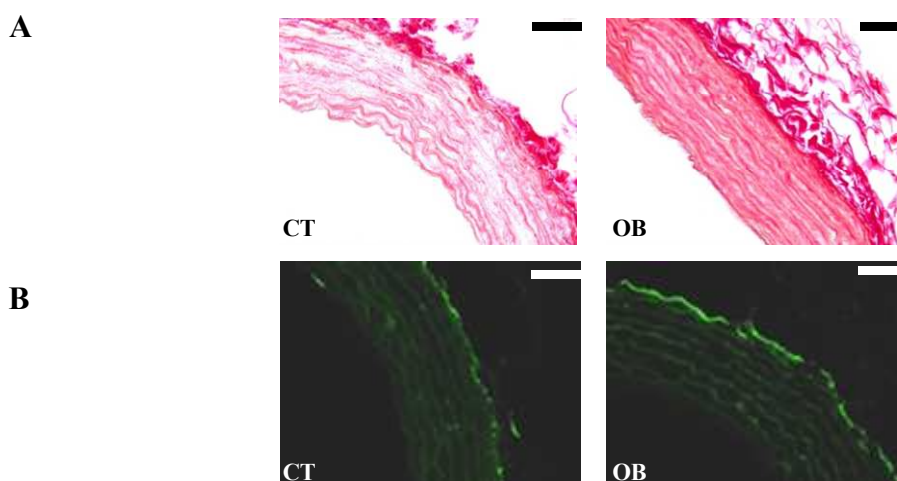


Figura 49: Microfotografías representativas de aortas teñidas con Rojo Sirio para valoración del contenido de colágeno (A) y autofluorescencia de elastina (B) en ratas alimentadas con una dieta estándar y en ratas alimentadas con una dieta con alto contenido en grasa. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μ m.

Observados los efectos de la dieta con alto contenido en grasa sobre la composición de la media de la aorta, estudiamos el proceso fibrótico a nivel vascular mediante diferentes ensayos complementarios.

El incremento en los niveles de colágeno total observado en los animales que reciben la dieta con alto contenido en grasa, se ve acompañado por un incremento en los niveles de colágeno no soluble (***p<0.001) (Figura 50A) y una disminución en los niveles de

colágeno soluble (** $p < 0.001$) (Figura 50B) sugiriendo una mayor estabilidad de la matriz extracelular.

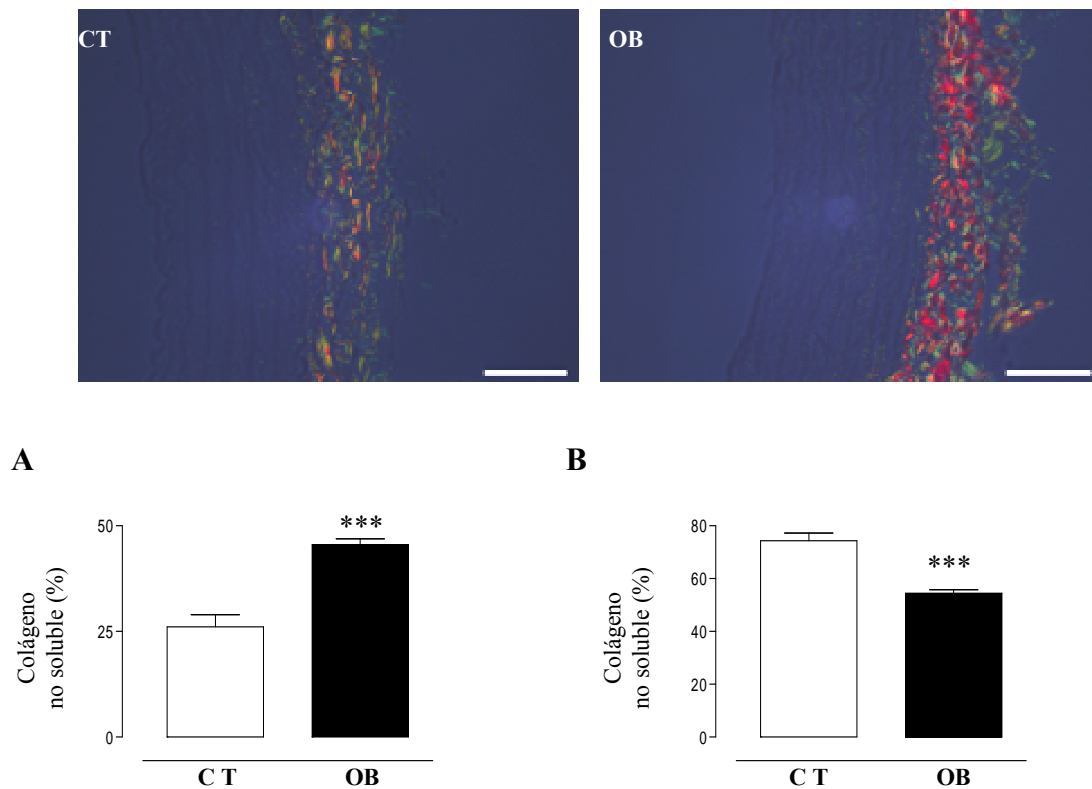


Figura 50: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre los niveles de colágeno no soluble (A) y de colágeno soluble (B) en la aorta de rata. Microfotografías representativas de cortes histológicos teñidos con Rojo Sirio e iluminados con luz polarizada. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μm . Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas por porcentaje de área teñida (** $p < 0.001$ vs.CT).

Este proceso fibrótico observado en los animales que reciben la dieta con alto contenido en grasa, parece ser debido en parte a un incremento en los niveles de colágeno tipo I. El análisis del ARNm mostró un incremento en los niveles del mismo (** $p < 0.001$), efecto que se confirmó mediante el análisis proteico de colágeno tipo I (** $p < 0.001$) (Figura 51A). También se observó un incremento en los niveles génicos de colágeno tipo III (** $p < 0.01$), sin encontrar modificaciones en los niveles proteicos de colágeno tipo III (Figura 51B).

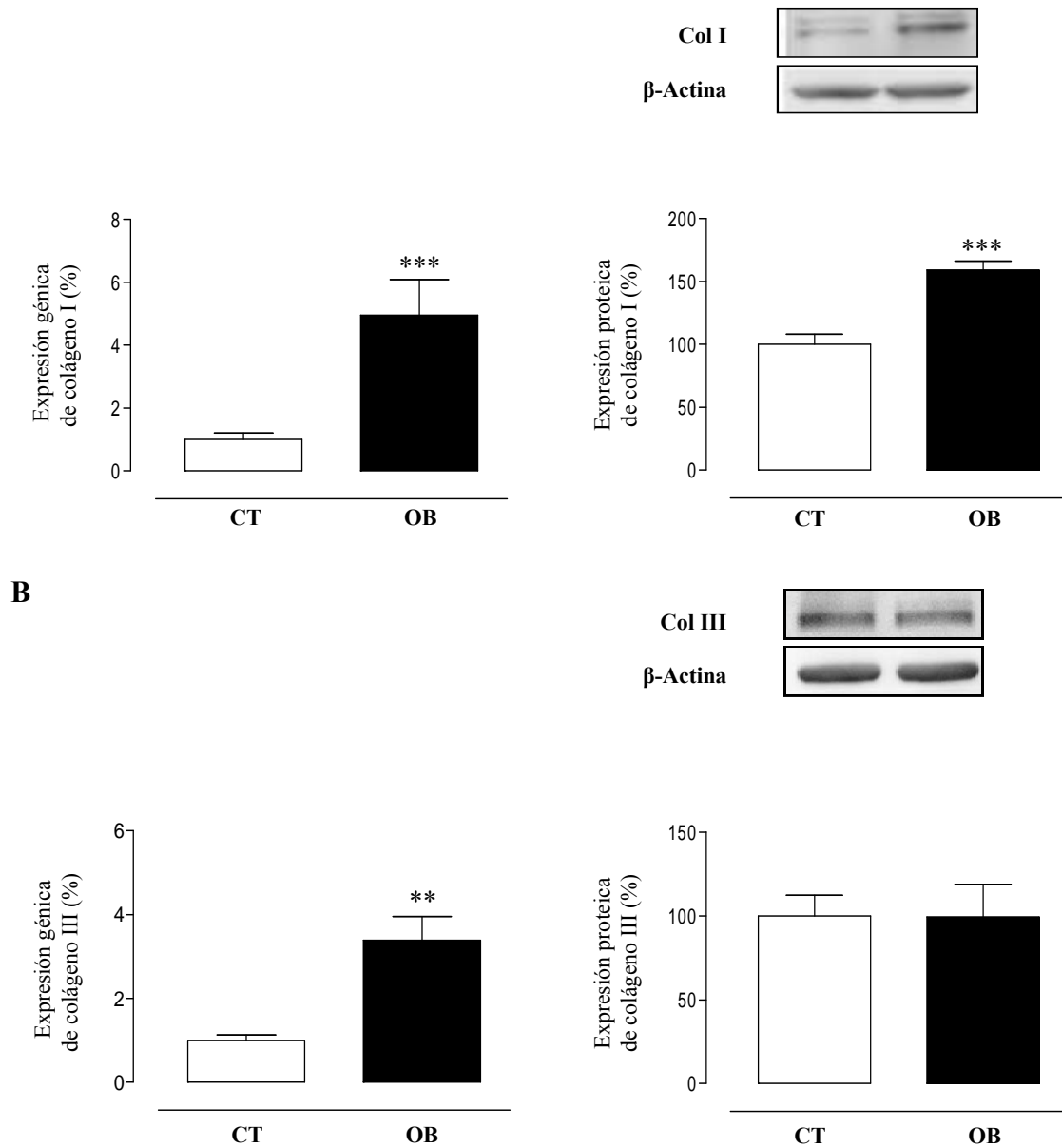


Figura 51: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la expresión de génica (izquierda) y proteica (derecha) de colágeno tipo I (A) y de colágeno tipo III (B) en la aorta de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por HPRT y por β -actina respectivamente (**p<0.01; ***p<0.001 vs. CT).

Del mismo modo, el análisis de otros componentes de la matriz extracelular muestra un incremento en los niveles de fibronectina tanto a nivel de expresión proteica (**p<0.01) (Figura 52A) en el grupo de animales OB, sin modificaciones en los niveles de elastina (Figura 52B).

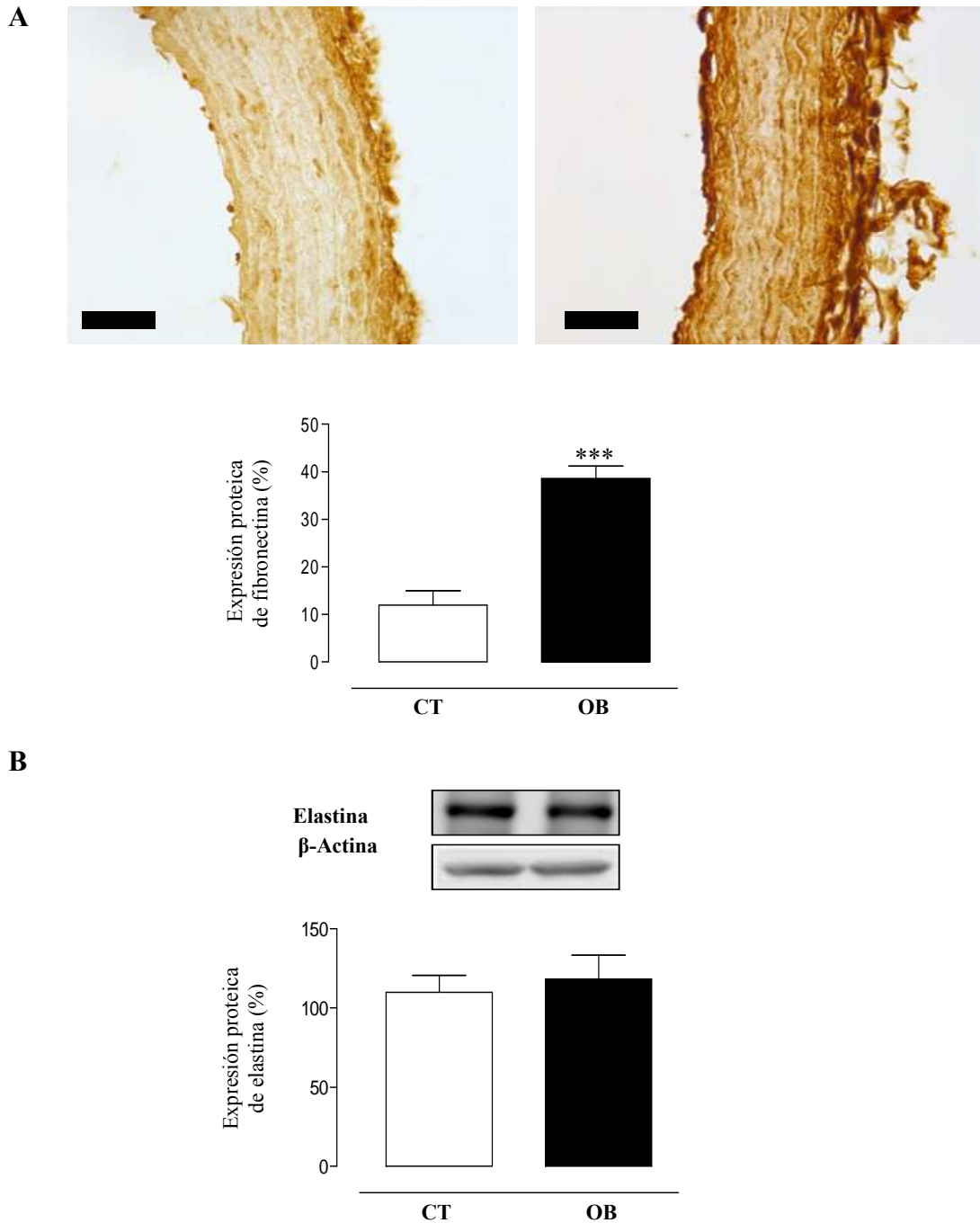


Figura 52: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre los niveles de fibronectina (A) y de elastina (B) en la aorta de ratas. Microfotografías representativas de cortes histológicos con tinción específica para fibronectina. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μ m. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por HPRT, por porcentaje de área teñida y por β -actina respectivamente (***) p <0.001 vs. CT).

Además de encontrar un incremento en la síntesis de algunos componentes de la matriz extracelular, también observamos una menor degradación ya que en el grupo de animales OB hay menores niveles proteicos de MMP-2 (** $p < 0.01$), sin observarse cambios en uno de sus inhibidores como es el TIMP-2 (Figura 53), sugiriendo una menor actividad, y por tanto una menor degradación de colágeno en comparación con el grupo CT.

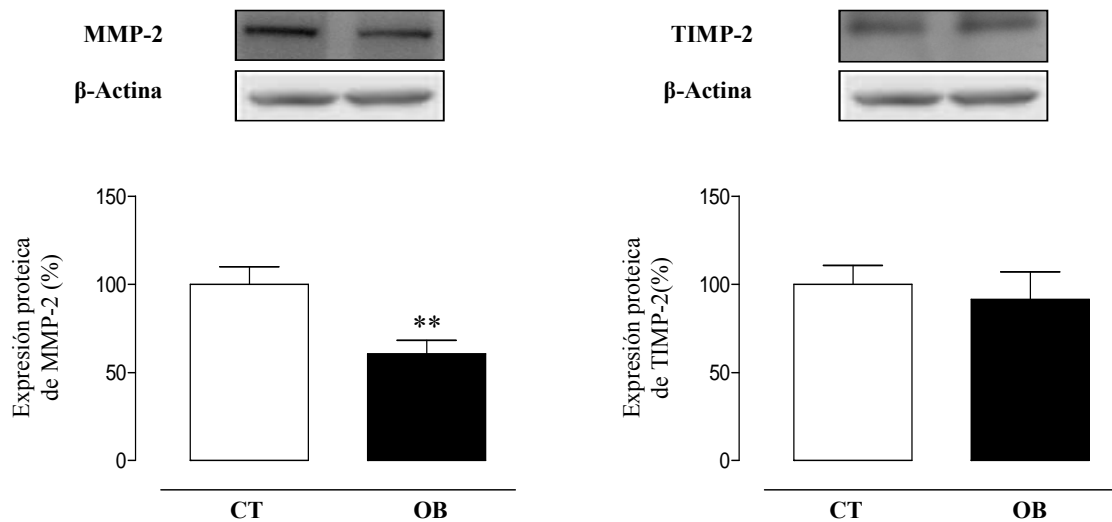
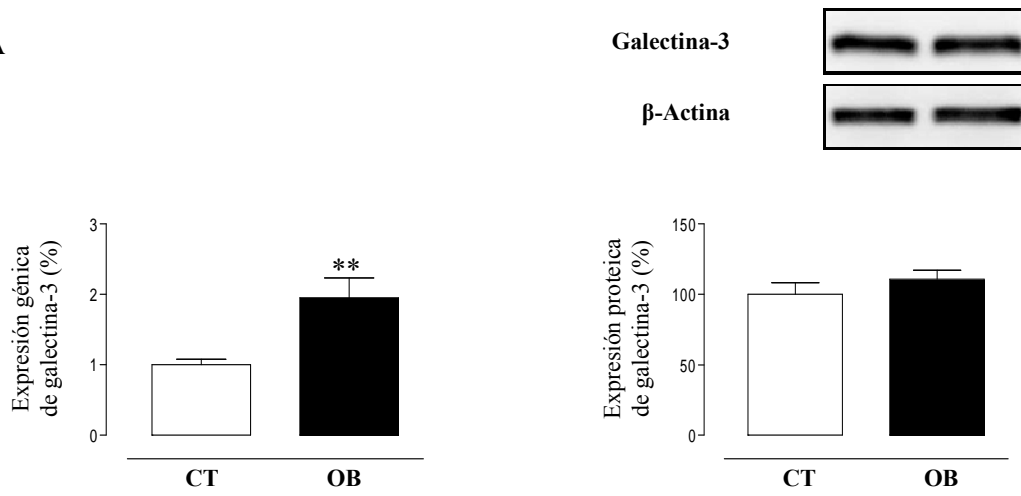


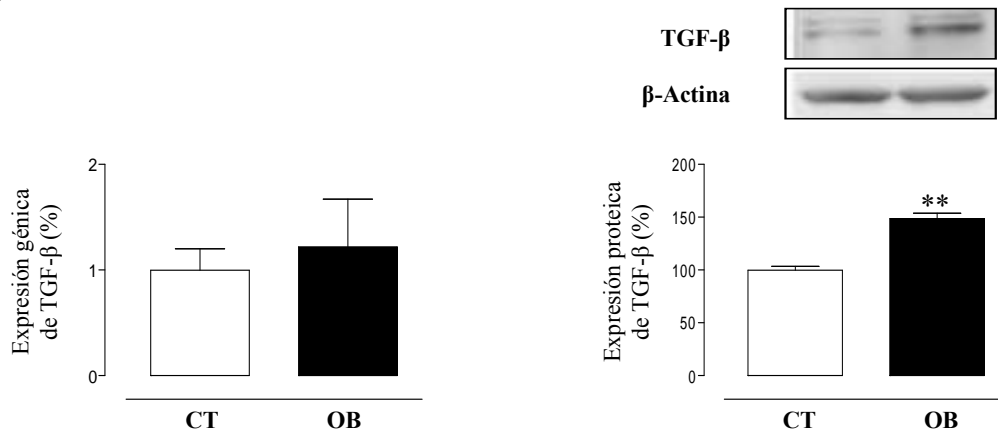
Figura 53: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la producción de MMP-2 (izquierda) y TIMP-2 (derecha) en la aorta de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por β -actina (** $p < 0.01$ vs. CT).

Observado el efecto de la dieta con alto contenido en grasa sobre la media de la aorta, exploramos los posibles mediadores implicados en el proceso fibrótico, como son la galectina-3, el TGF- β y el CTGF. A pesar de observar un incremento en los niveles de ARNm de galectina-3 (** $p < 0.01$) no encontramos modificaciones en los niveles proteicos de galectina-3 (Figura 54A). En el caso del TGF- β el efecto es el contrario ya que no observamos ninguna modificación en los niveles de ARNm, pero comprobamos como hay un incremento en los niveles proteicos de este factor de crecimiento (** $p < 0.01$) (Figura 54B). Asimismo, encontramos un incremento en los niveles de ARNm y proteína de CTGF total (* $p < 0.01$) (Figura 54C).

A



B



C

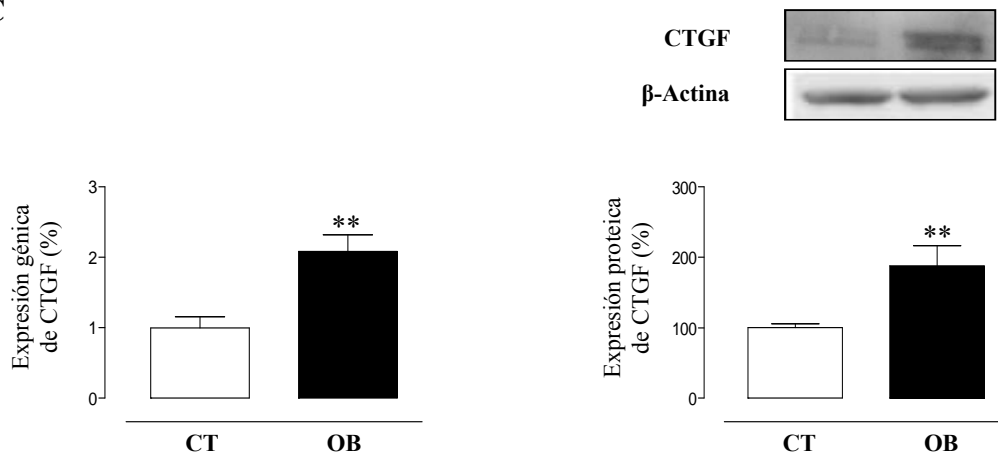


Figura 54: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la expresión de génica (izquierda) y proteica (derecha) de galectina-3 (A), TGF- β (B) y CTGF (C) en la aorta de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por HPRT y por β -actina respectivamente (**p<0.01 vs. CT).

II.3.3. Efectos sobre la producción vascular de aniones superóxido $O_2^{\cdot-}$.

Con el fin de estudiar la producción de $O_2^{\cdot-}$, se analizó la intensidad de fluorescencia roja del dihidroetidio en cortes histológicos incubados con DHE. El DHE ha demostrado que se oxida por la acción del $O_2^{\cdot-}$ produciendo etidio acumulado en el núcleo que tiñe el ADN.

En la aorta de los animales alimentados con la dieta con alto contenido en grasa se observó un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (** $p < 0.01$) (Figura 55).

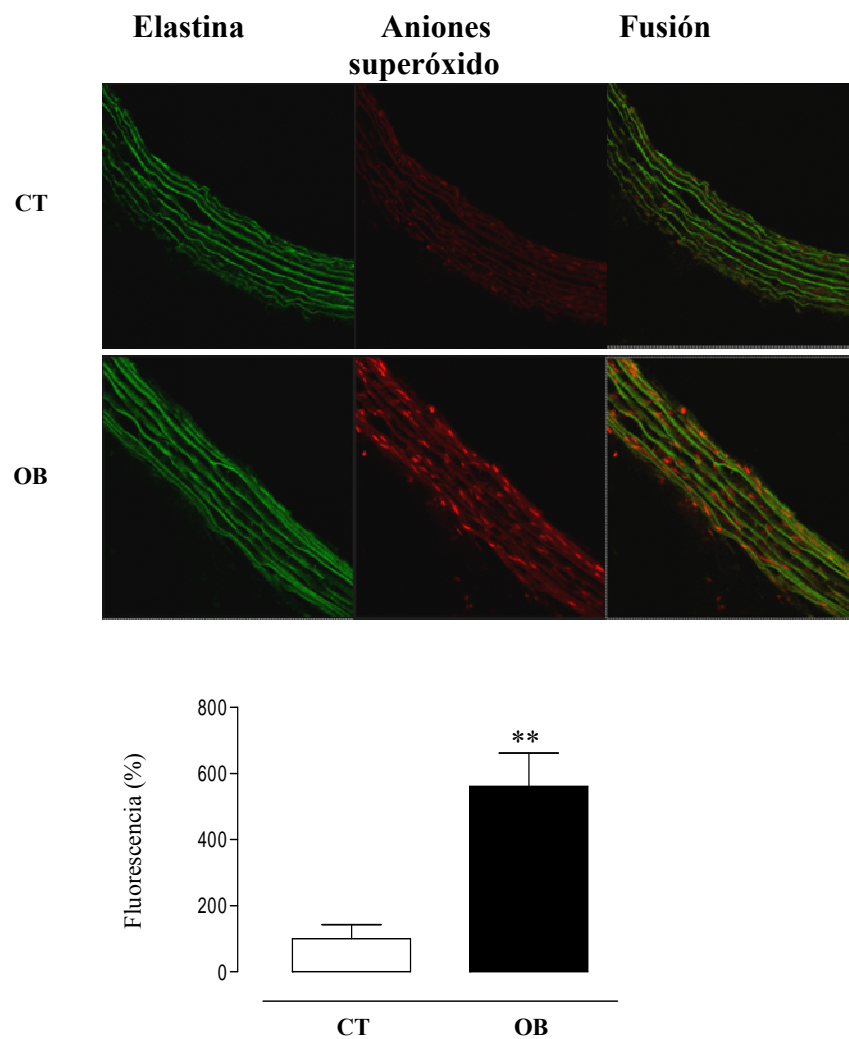


Figura 55: Efecto la obesidad inducida por dieta sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ en la aorta de ratas. Microfotografías representativas de microscopia confocal en cortes histológicos incubados con DHE. Aumento al 40X. Tamaño de imagen 379x379 μm . Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresados en unidades arbitrarias (** $p < 0.01$ vs. CT).

II.3.4. Efectos sobre la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR a nivel vascular.

Con objeto de valorar la posible activación de la vía PI-3K/Akt/mTOR se midió la fosforilación de Akt, además de un intermediario de mTOR como es el P70. Los resultados se expresaron como el cociente de la proteína fosforilada con respecto a la proteína no fosforilada, normalizados previamente con su control interno de β -actina.

El grupo de animales que recibió la dieta con alto contenido en grasa mostró un incremento en la fosforilación de Akt respecto al grupo alimentado con una dieta estándar (** $p < 0.01$) (Figura 56A), sin observarse diferencias en la fosforilación de P70 (Figura 56B).

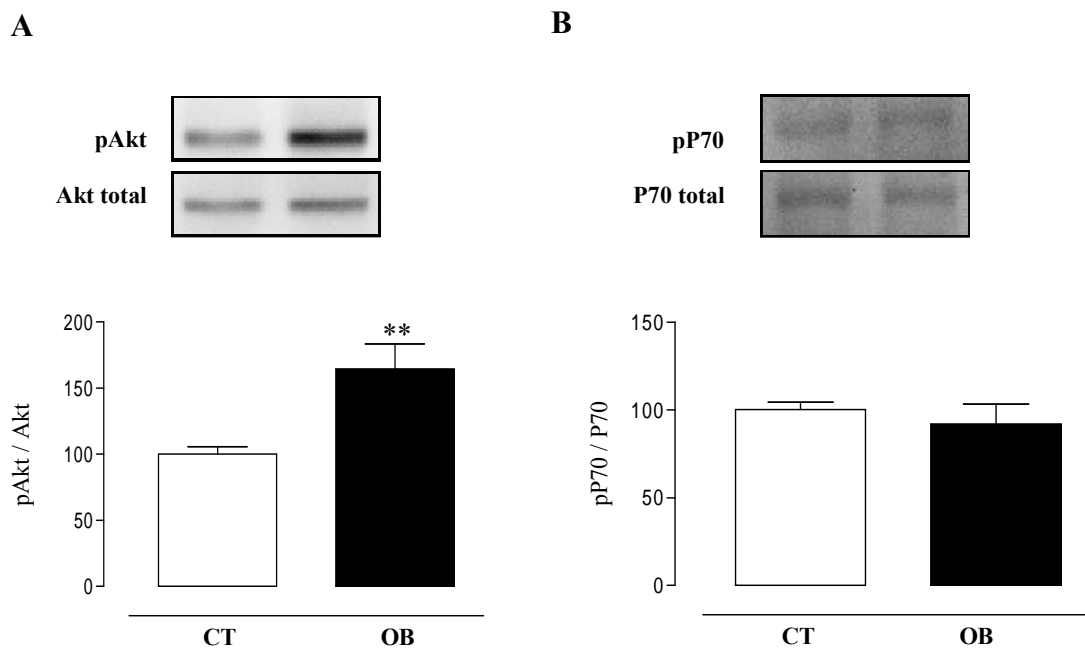


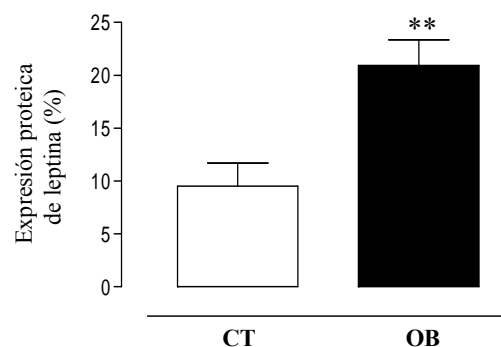
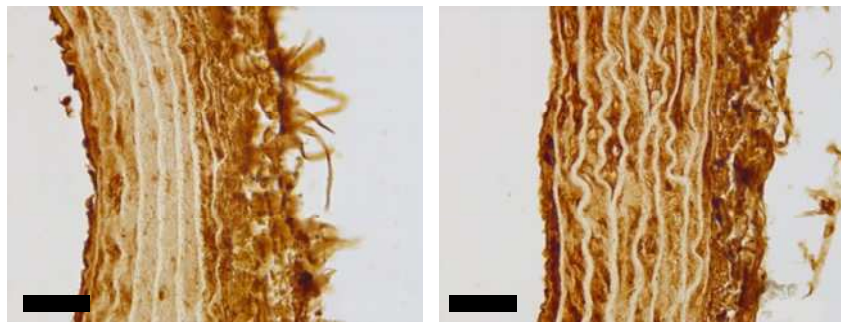
Figura 56: Efecto de la obesidad inducida por dieta sobre la fosforilación de Akt (A) y de P70 (B) en la aorta de ratas. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por Akt total y la P70 total respectivamente. (** $p < 0.01$ vs. CT).

II.3.5. Efectos sobre los niveles vasculares de leptina y adiponectina.

Exploramos posibles mediadores implicados en el proceso fibrótico y oxidante observado en la aorta de los animales alimentados con la dieta con alto contenido en grasa. Estudiamos si el incremento en el peso corporal del grupo OB era capaz de afectar los niveles vasculares tanto de leptina como de adiponectina, debido a que a la leptina se le han atribuido tanto efectos deletéreos como protectores sobre el sistema cardiovascular. En cambio, a la adiponectina se le atribuyen efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular.

En la aorta de los animales alimentados con la dieta con alto contenido en grasa observamos un incremento en los niveles proteicos de leptina ($*p<0.05$) (Figura 57A), sin encontrar ningún cambio en los niveles proteicos de adiponectina (Figura 57B).

A



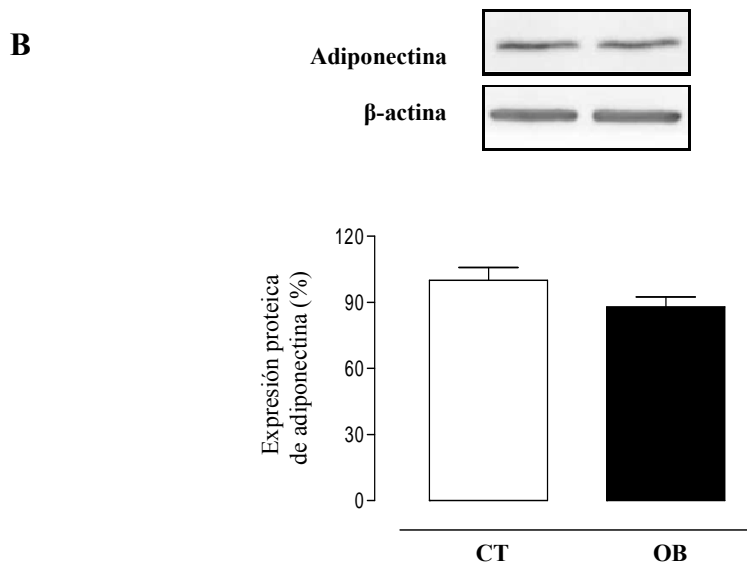


Figura 57: Efecto la obesidad inducida por dieta sobre la expresión proteica de leptina (A) y adiponectina (B) en la aorta de ratas. Microfotografías representativas de cortes histológicos con tinción específica para leptina. Aumento al 40X. Barra de escala 50 μ m. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por β -actina (**p<0.01 vs. CT).

II.3.6. Asociaciones encontradas entre los niveles vasculares de leptina y mediadores fibróticos en la aorta.

Al observar el incremento en los niveles vasculares de leptina junto con el proceso fibrótico que ocurre en la aorta de los animales que recibieron la dieta con alto contenido en grasa, quisimos comprobar si existía alguna asociación entre dichos valores.

Comprobamos como existe una correlación entre los niveles vasculares de leptina y el contenido de colágeno total ($r^2=0.4097$; $p=0.0462$), los niveles proteicos de colágeno tipo I ($r^2=0.5236$; $p=0.0424$), MMP-2 ($r^2=0.3675$; $p=0.0048$), TGF- β ($r^2=0.5597$; $p=0.0081$), y CTGF ($r^2=0.4438$; $p=0.0354$) (Figura 58) mostrando como la leptina podría estar participando en la fibrosis observada en la aorta de los animales OB.

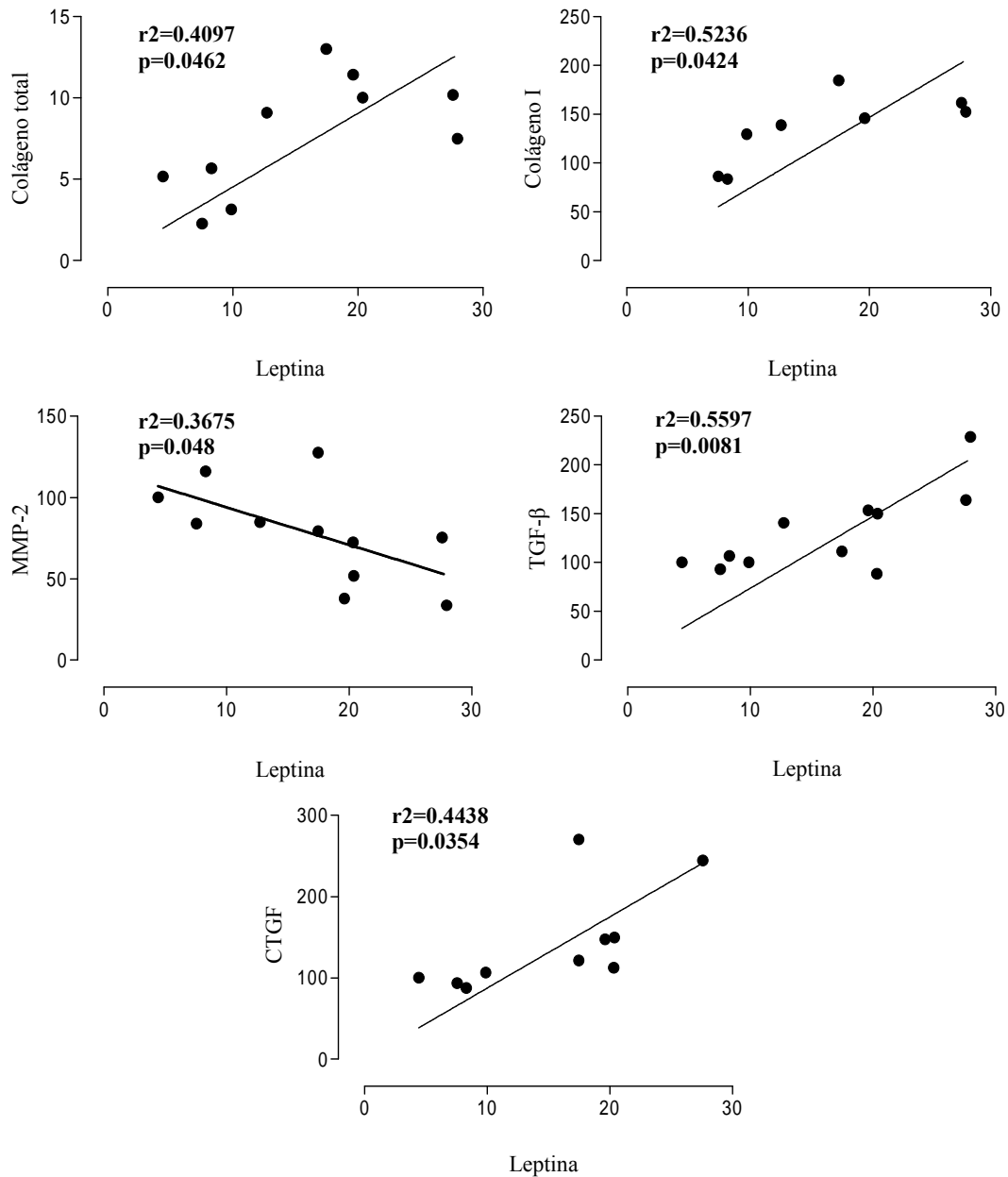


Figura 58: Análisis de regresión lineal demostrando una relación positiva entre los niveles vasculares de leptina y el contenido de colágeno, los niveles proteicos de colágeno tipo I, de TGF- β y de CTGF. Asimismo, observamos una relación negativa entre los niveles vasculares de leptina y los niveles proteicos de MMP-2.

Nuestros datos muestran que las ratas obesas presentan un remodelado vascular caracterizado por un aumento del grosor de la media y de la rigidez del vaso.

El proceso fibrótico vascular observado es consecuencia de un aumento de los niveles de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina. Dicho proceso se acompaña por un proceso oxidante que es caracterizado por un incremento en la presencia de aniones superóxido en la aorta de las ratas obesas.

Los niveles de colágeno, parecen ser debidos a incrementos en la síntesis de colágeno tipo I y una disminución en la degradación del mismo.

A su vez, esos cambios en la síntesis de colágeno tipo I parecen ser debidos a incrementos en distintos mediadores profibróticos como son el TGF- β y el CTGF.

Asimismo, nuestros datos muestran como la leptina, producida localmente en la aorta, podría participar en este remodelado vascular asociado a la obesidad, mediante un incremento en la producción de colágeno junto con una menor degradación del mismo, mostrando a esta adipocina como una posible diana terapéutica.

II.3.7. Efectos de la leptina sobre células de músculo liso de rata adulta.

a) Efectos de la leptina sobre la matriz extracelular en células de músculo liso.

La estimulación con leptina a la concentración de 100 ng/ml incrementó significativamente los niveles de colágeno tipo I en células de músculo liso tanto a nivel de expresión génica (tras 6 horas de estimulación) (* $p < 0.05$), como proteica (tras 24 horas de estimulación) (** $p < 0.01$) (Figura 59).

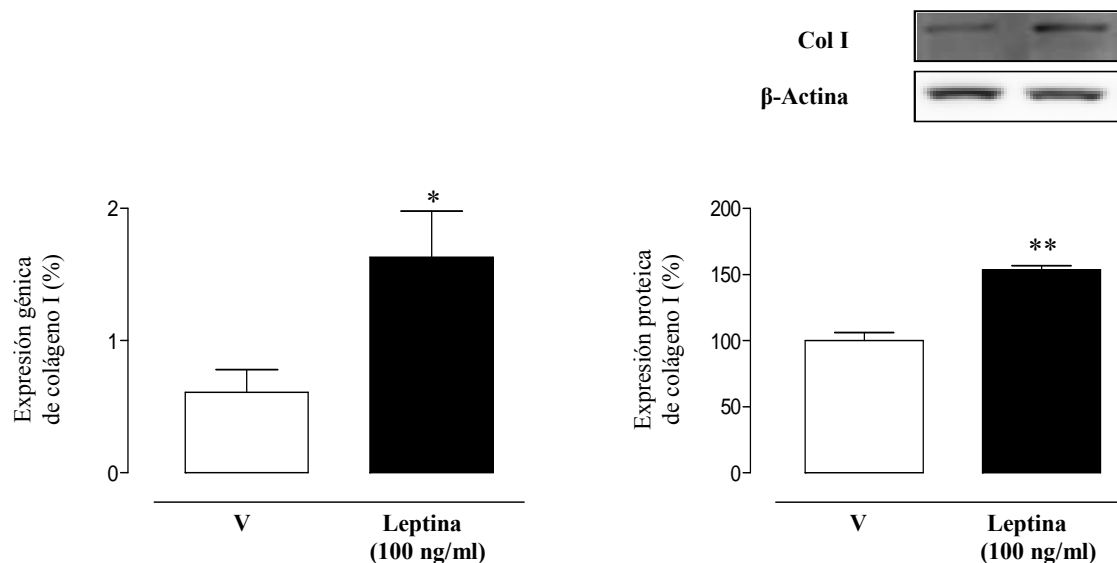


Figura 59: Efecto de la leptina (100 ng/ml) sobre la producción de colágeno tipo I a nivel de expresión génica (izquierda) y proteica (derecha) en células de músculo liso de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos expresados en unidades arbitrarias normalizadas por HPRT y por β -actina respectivamente. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. vehículo).

Asimismo, la leptina a la concentración de 100 ng/ml, fue capaz de incrementar significativamente los niveles de fibronectina en células de músculo liso tanto a nivel de expresión génica (tras 6 horas de estimulación) (** $p < 0.01$), como proteica (tras 24 horas de estimulación) (** $p < 0.01$) (Figura 60A), sin generar modificaciones en los niveles proteicos de elastina (Figura 60B).

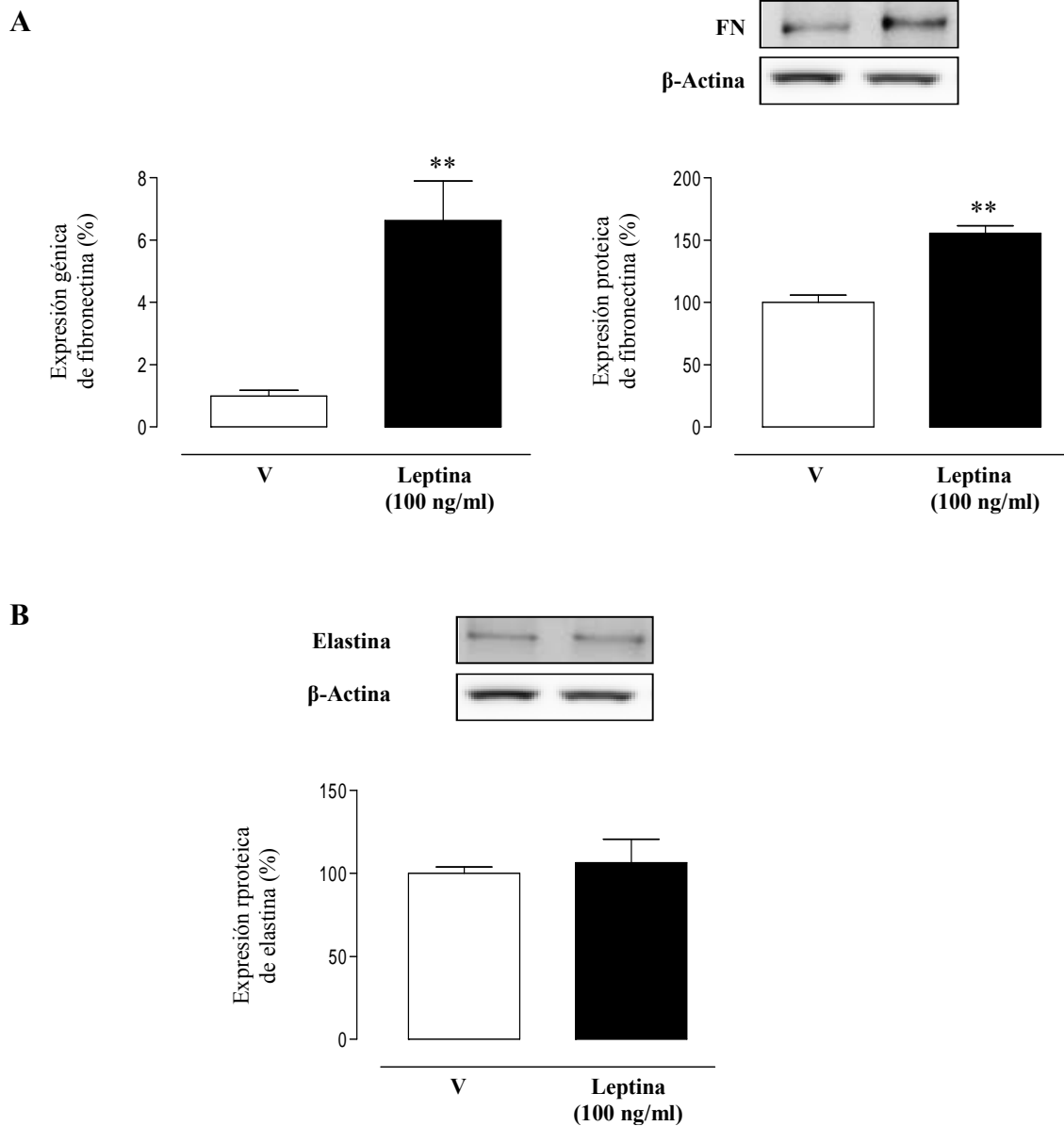


Figura 60: Efecto de la leptina (100 ng/ml) sobre la producción de fibronectina a nivel de expresión génica (izquierda) y proteica (derecha) (A) y sobre la producción proteica de elastina (B) en células de músculo liso de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos expresados en unidades arbitrarias normalizadas por HPRT y por β -actina respectivamente (** p <0.01 vs. vehículo).

De la misma manera, la leptina a la concentración de 100 ng/ml, produjo un incremento significativo en la actividad de proteínas que degradan la matriz extracelular (** $p < 0.01$) como es la MMP-2 (Figura 61A), MMP-9 (Figura 61B) y de MMP-13 (Figura 61C) en las células de músculo liso de rata tras 24 horas de estimulación.

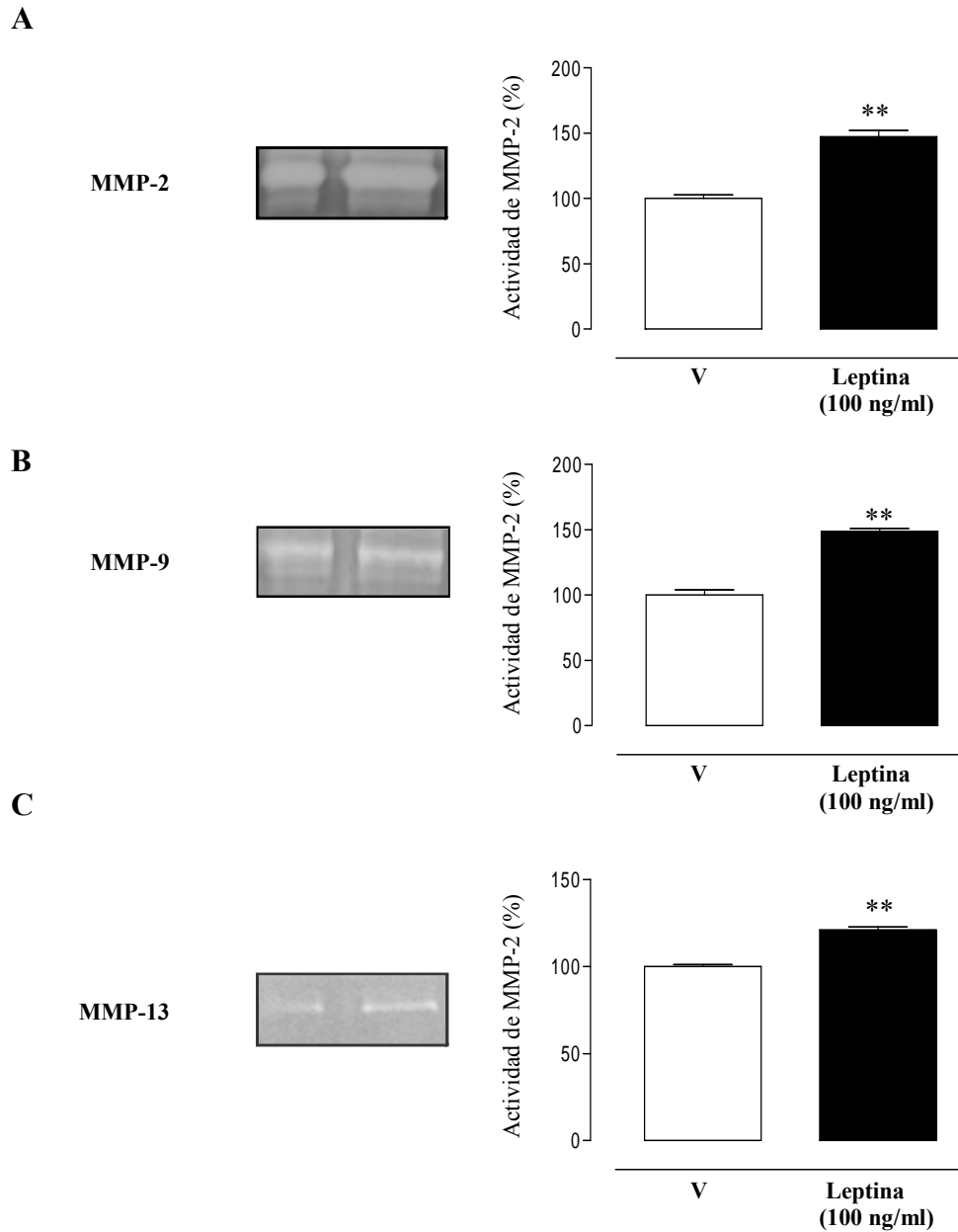
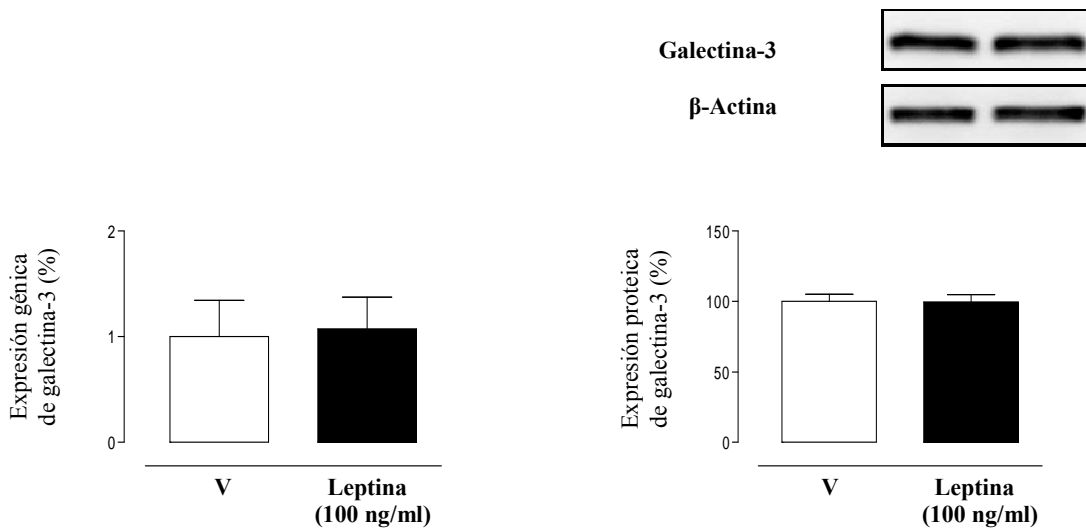


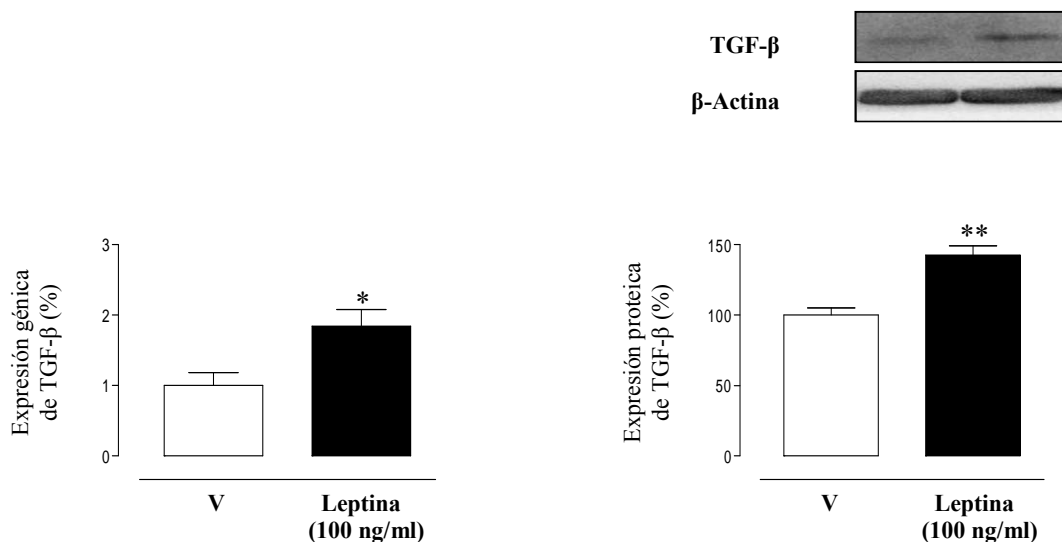
Figura 61: Efecto de leptina 100 ng/ml sobre la actividad de MMP-2 (A), MMP-9 (B) y MMP-13 (C) en células de músculo liso de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos expresados en unidades arbitrarias. (** $p < 0.01$ vs. vehículo).

Tras observar el efecto de la leptina sobre la producción de colágeno tipo I, estudiamos la implicación de diferentes mediadores profibróticos como, el TGF- β y el CTGF. Comprobamos como la leptina a la concentración de 100 ng/ml no generó modificaciones en la expresión génica ni proteica de galectina-3 (Figura 62A). Sin embargo, la leptina generó un incremento significativo tanto a nivel de expresión génica (tras 6 horas de estimulación), como proteica (tras 24 horas de estimulación) en los niveles de TGF- β (* p <0.05; ** p <0.01) (Figura 62B) y de CTGF total (* p <0.05; ** p <0.01) (Figura 62C).

A



B



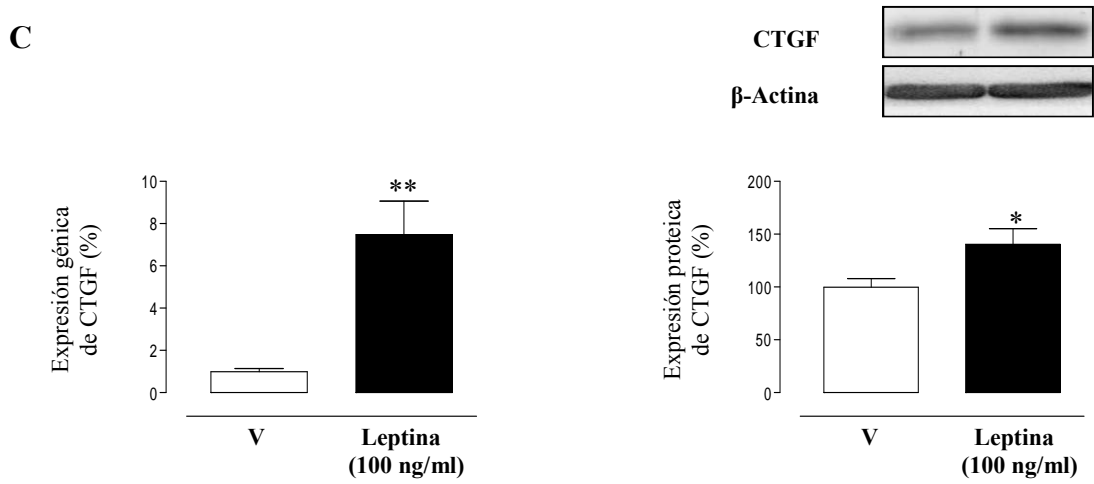


Figura 62: Efecto de la leptina (100 ng/ml) sobre la producción de galectina-3 (A), TGF- β (B) y CTGF (C) a nivel de expresión génica (izquierda) y proteica (derecha) en células de músculo liso de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos expresados en unidades arbitrarias normalizadas por HPRT y por β -actina respectivamente (* p <0.05; ** p <0.01 vs. vehículo).

b) Efectos de la leptina sobre la producción de aniones superóxido $O_2^{\cdot-}$ en células de músculo liso.

Con el fin de estudiar la producción de $O_2^{\cdot-}$, se analizó la intensidad de fluorescencia roja del dihidroetidio en células estimuladas con leptina a la concentración de 100 ng/ml a diferentes tiempos durante utilizando DHE. El DHE ha demostrado que se oxida por la acción del $O_2^{\cdot-}$ produciendo etidio acumulado en el núcleo que tiñe el ADN.

La leptina no fue capaz de modificar la producción de $O_2^{\cdot-}$ ni a las 2 horas ni a las 24 horas de estimulación ($***p<0.001$), aunque se observó un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ a las 6 horas de estimulación, mostrando el efecto prooxidante de la leptina (Figura 63).

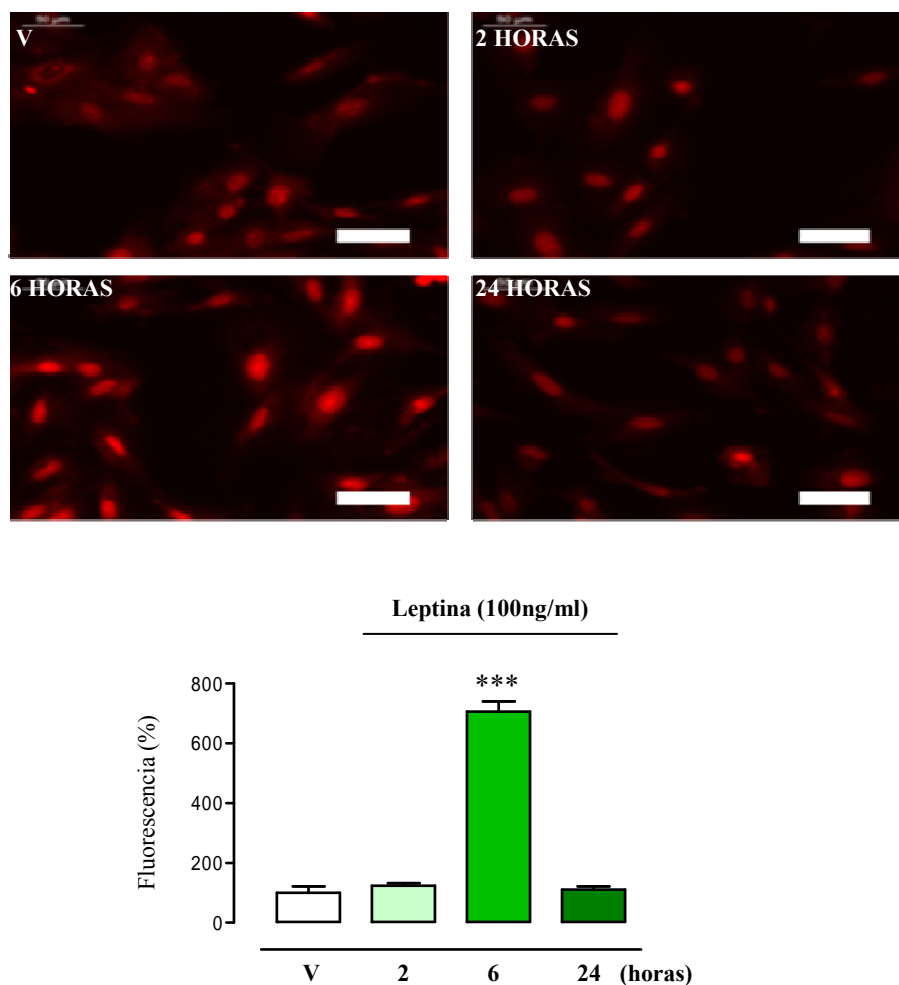


Figura 63: Efecto de leptina (100 ng/ml) a diferentes tiempos sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ en células de músculo liso de rata. Microfotografías representativas de células de músculo liso incubadas con DHE. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. ($***p<0.001$ vs. vehículo).

c) Influencia del estrés oxidativo sobre los efectos de la leptina en células de músculo liso.

Con objeto de valorar la implicación que tiene el estrés oxidativo sobre las acciones profibróticas de la leptina en células de músculo liso de rata, estimulamos las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml durante 6 horas en presencia de un antioxidante inespecífico como es la melatonina a la concentración de (10^{-3} mmol/l).

Como era de esperar, la presencia de melatonina, previno el incremento en la producción de O_2^- generado por la leptina ($\dagger\dagger\dagger p < 0.001$) (Figura 64). La melatonina en ausencia de leptina no generó ningún efecto sobre la producción de O_2^-

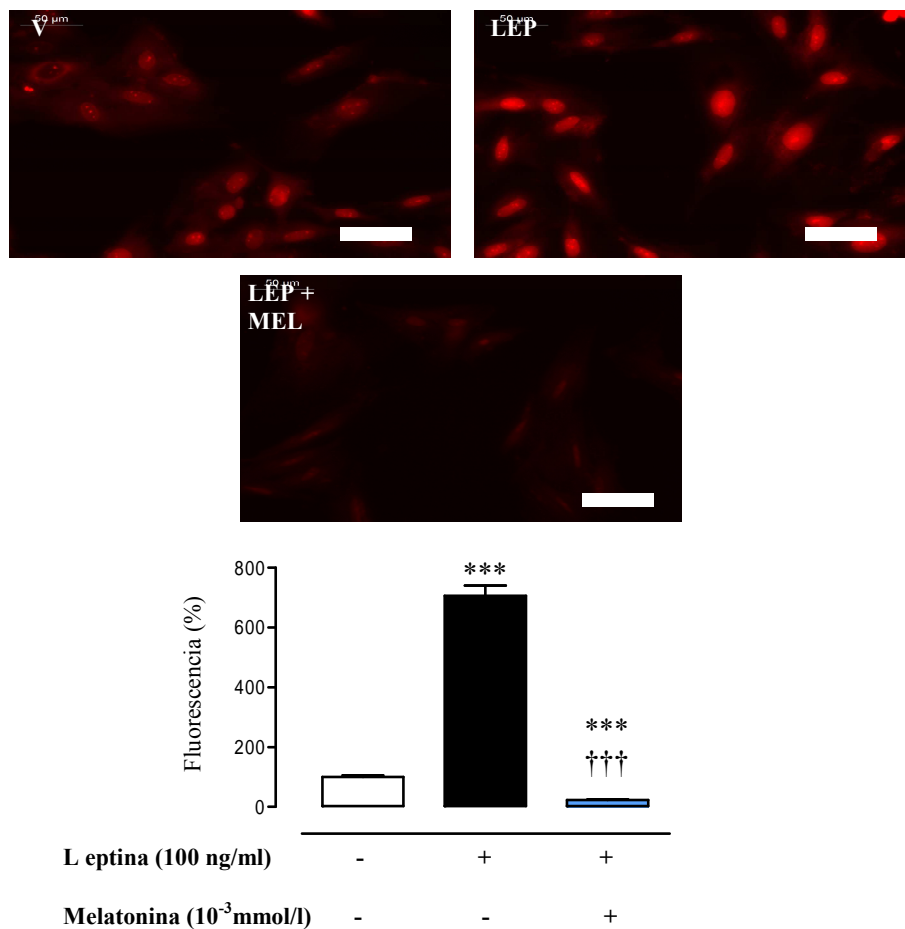


Figura 64: Efecto de melatonina (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de O_2^- inducida por la leptina (100 ng/ml) a las 6 horas de estimulación en células de músculo liso de rata. Microfotografías representativas de cardiomiocitos incubados con DHE. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (***) $p < 0.001$ vs. vehículo; ($\dagger\dagger\dagger$) $p < 0.001$ vs. leptina 100 ng/ml).

Validado el empleo de melatonina como antioxidante a las condiciones usadas, estudiamos los efectos sobre la matriz extracelular de la leptina (100 ng/ml) en presencia de melatonina (10^{-3} mmol/l) tras 24 horas de estimulación. Comprobamos como la presencia de melatonina, fue capaz de prevenir la síntesis tanto de colágeno tipo I ($\dagger p < 0.05$) como de fibronectina inducida por la leptina ($\dagger p < 0.05$), mostrando el papel del estrés oxidativo sobre el efecto profibrótico de la leptina (Figuras 65A y 65B). La melatonina en ausencia de leptina no generó ningún efecto sobre la síntesis de colágeno tipo I ni de fibronectina.

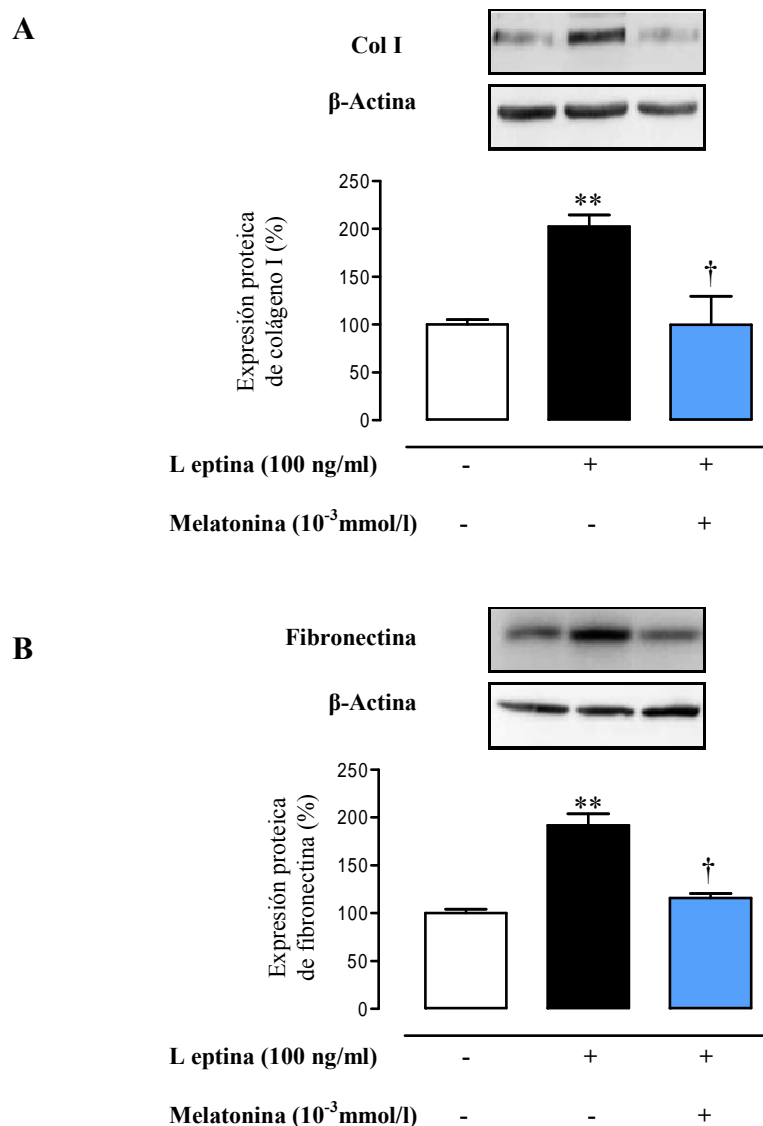


Figura 65: Efecto de melatonina (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de colágeno tipo I (A) y de fibronectina (B) generada por la leptina (100 ng/ml) a las 24 horas de estimulación en células de músculo liso de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (** $p < 0.01$ vs vehículo; $\dagger p < 0.05$ vs leptina 100 ng/ml).

Observado este efecto de la melatonina sobre la producción de colágeno tipo I, estudiamos los niveles proteicos de los mediadores profibróticos en los cuales la leptina (100 ng/ml) generó un incremento a las 24 horas de estimulación. De este modo observamos como la melatonina fue capaz de prevenir el incremento en los niveles de TGF- β y de CTGF total a las ($\dagger\dagger p < 0.01$) (Figura 66A y 66B). La melatonina en ausencia de leptina no generó ningún efecto en ninguno de los mediadores estudiados.

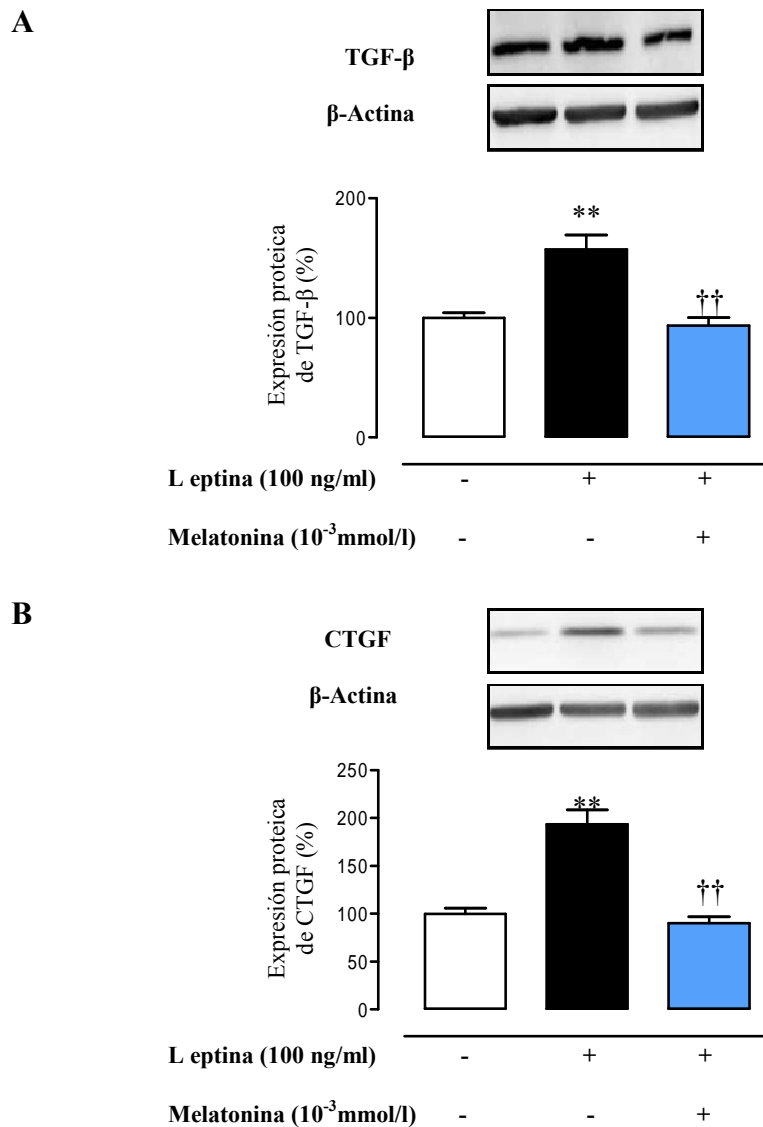


Figura 66: Efecto de melatonina (10^{-3} mmol/l) sobre la producción de TGF- β (A) y de CTGF total (B) generada por la leptina (100 ng/ml) en células de músculo liso de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (** $p < 0.01$ vs. vehículo; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

d) Influencia de la activación de la vía PI-3K/Akt/mTOR sobre los efectos de la leptina en células de músculo liso.

Con objeto de valorar la posible activación de la vía PI-3K/Akt/mTOR se midió la fosforilación de Akt, además de un intermediario de mTOR como es el P70. Los resultados se expresaron como el cociente de la proteína fosforilada con respecto a la proteína no fosforilada, normalizados previamente con su control interno de β -actina.

La leptina generó una activación/fosforilación de Akt, tras 24 horas de estimulación de las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml (** $p < 0.01$) (Figura 67A), sin generar modificaciones en la fosforilación de P70 (Figura 67B).

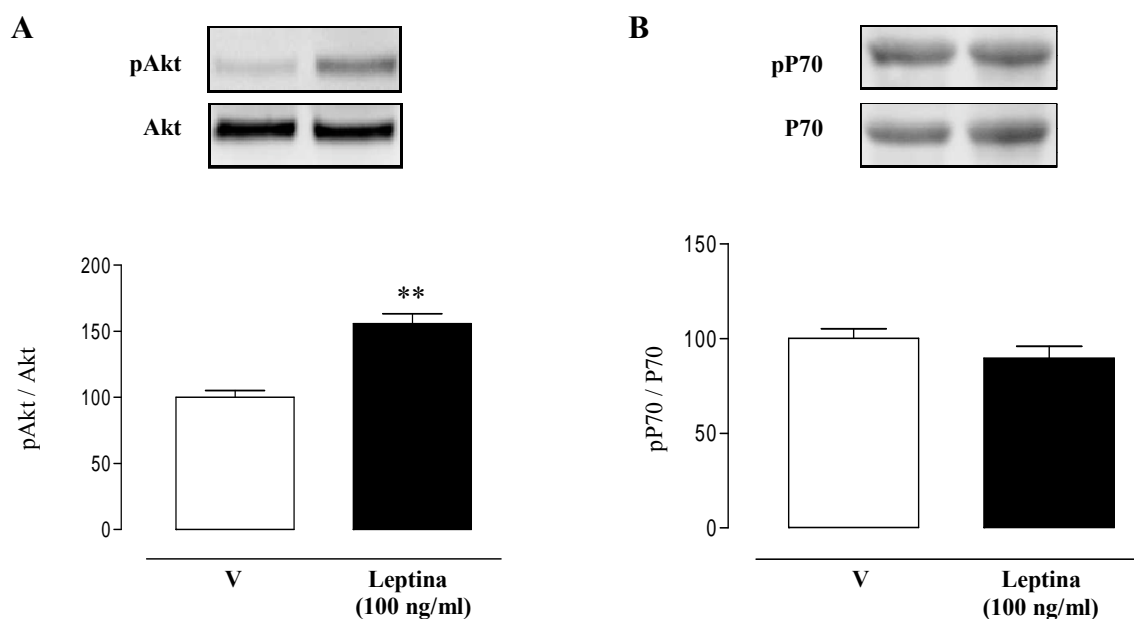


Figura 67: Efecto de la leptina 100 ng/ml sobre la fosforilación de Akt (A) y de P70 (B) en células de músculo liso de rata. Las gráficas representan la media \pm EEM de cada grupo (n=7) expresadas en unidades arbitrarias normalizadas por la Akt total y la P70 total respectivamente. (** $p < 0.01$ vs. vehículo).

Observada la activación de la vía PI3K/Akt por acción de la leptina valoramos la implicación que tiene dicha vía sobre el estrés oxidativo producido por la leptina en células de músculo liso de rata. Estimulamos las células con leptina a la concentración de 100 ng/ml durante 6 horas en presencia de un inhibidor de la vía PI3K/Akt como es el LY294002 (2×10^{-4} mmol/L).

La presencia de LY294002, no fue capaz de prevenir el incremento en la producción de O_2^- generado por la leptina (Figura 68). El LY294002 en ausencia de leptina no generó ningún efecto sobre la producción de O_2^-

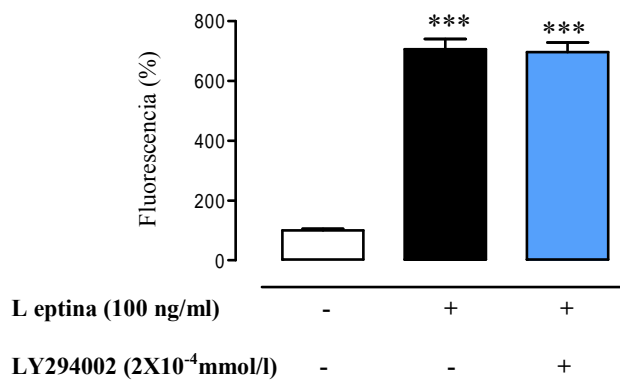
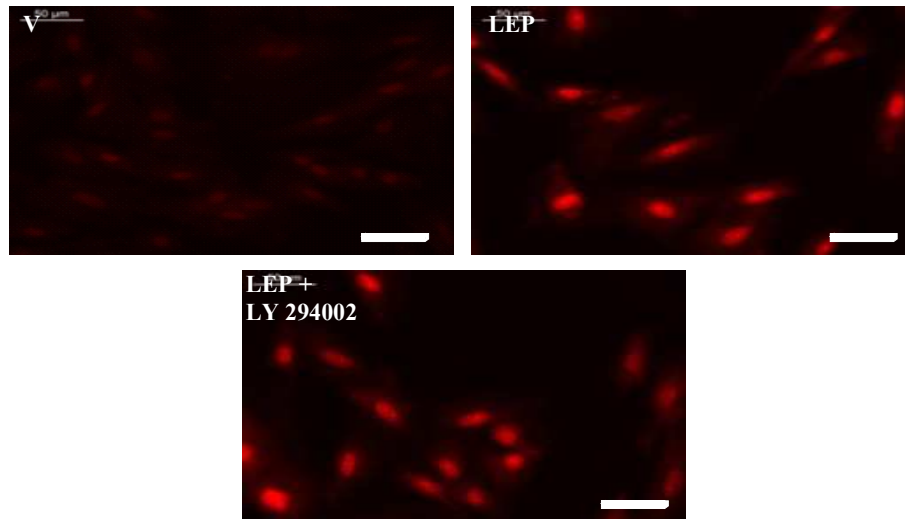


Figura 68: Efecto de LY294002 (2×10^{-4} mmol/l) sobre la producción de O_2^- inducida por la leptina (100 ng/ml) a las 6 horas de estimulación en células de músculo liso de rata. Microfotografías representativas de cardiomiocitos incubados con DHE. Aumento al 40x. Barra de escala 50 μ m. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (***) $p < 0.001$ vs. vehículo).

Estudiamos la posible implicación de dicha vía sobre los efectos de la matriz extracelular ejercidos por la leptina. Comprobamos como la presencia de LY294002 fue capaz de prevenir tanto la síntesis de colágeno tipo I ($\dagger p < 0.05$), como de fibronectina ($\dagger\dagger p < 0.01$) inducido por la leptina mostrando el papel de la vía PI3K/Akt sobre el efecto profibrótico de la leptina (Figuras 69A y 69B). El LY294002 en ausencia de leptina no generó ningún efecto sobre la síntesis de colágeno tipo I ni de fibronectina.

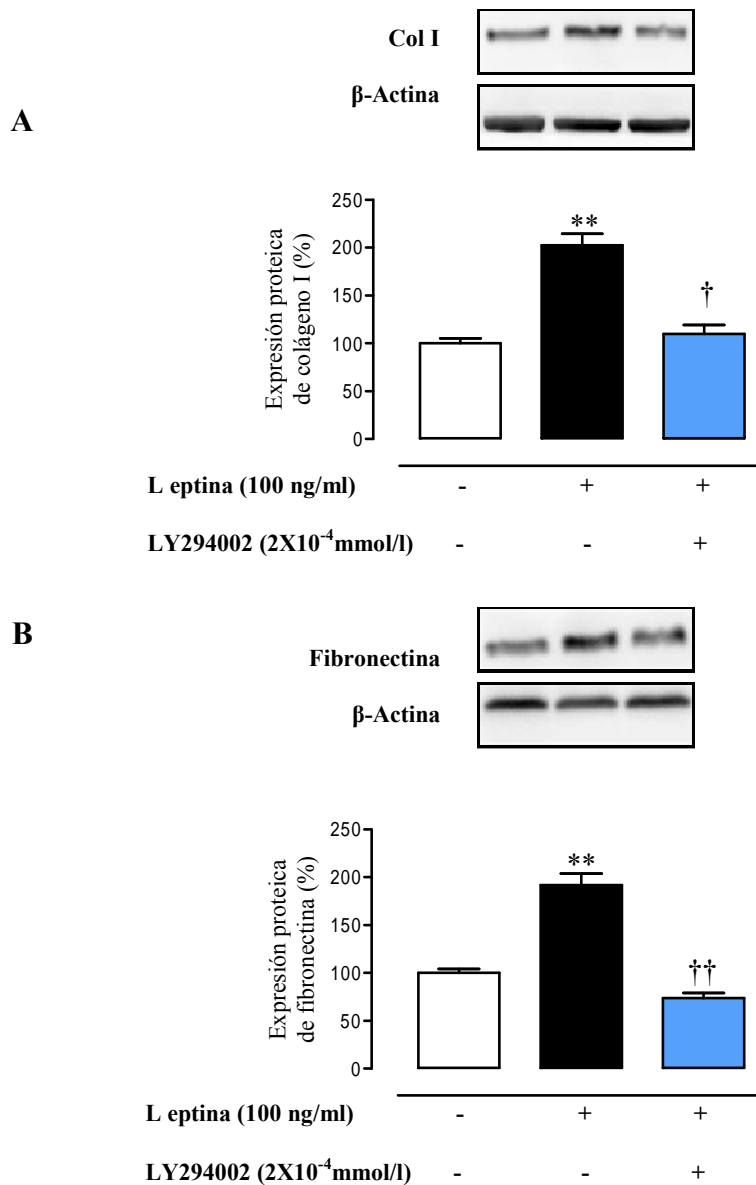
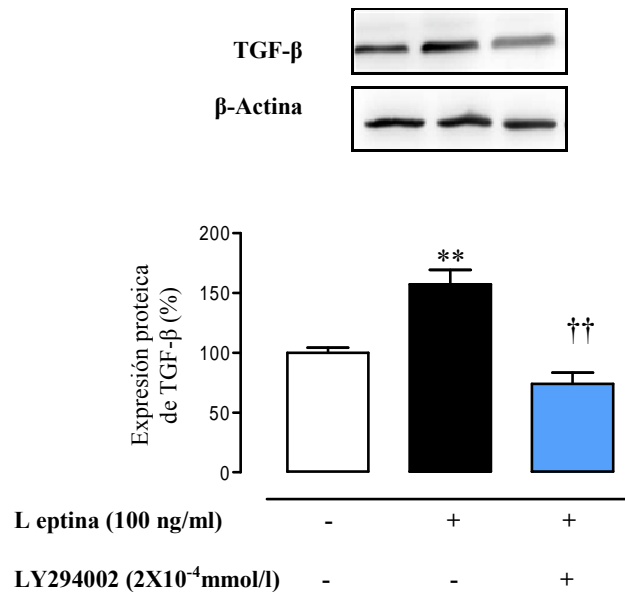


Figura 69: Efecto de LY294002 (2×10^{-4} mmol/l) sobre la producción de colágeno tipo I (A) y de fibronectina (B) generada por la leptina (100 ng/ml) a las 24 horas de estimulación en células de músculo liso de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (** $p < 0.01$ vs. vehículo; $\dagger p < 0.05$; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

Observado este efecto del LY294002 sobre la producción de colágeno tipo I, estudiamos los niveles proteicos de los mediadores profibróticos analizados anteriormente los cuales son inducidos por la leptina (100 ng/ml). De este modo observamos como el LY294002 fue capaz de prevenir el incremento en los niveles de TGF- β y de CTGF total ($\dagger\dagger p < 0.01$) a las 24 horas de estimulación (Figura 70A y 70B). El LY294002 en ausencia de leptina no generó ningún efecto sobre la síntesis de ninguno de los mediadores estudiados.

A



B

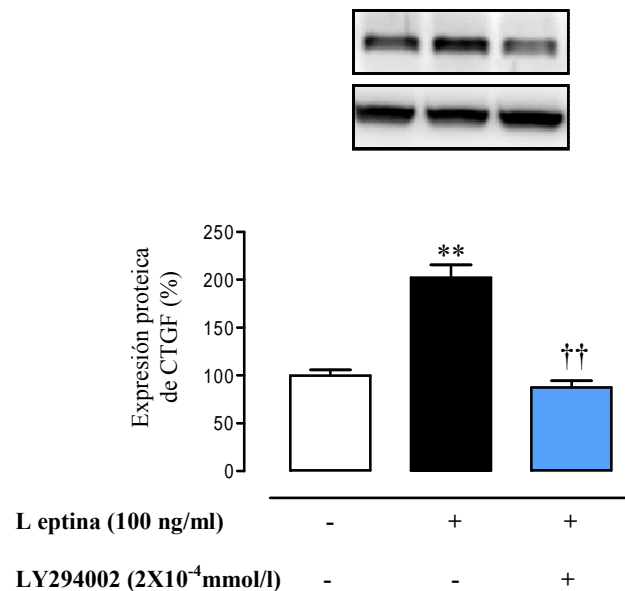


Figura 70: Efecto de LY294002 (2×10^{-4} mmol/l) sobre la producción de TGF- β (A) y de CTGF total (B) generada por la leptina (100 ng/ml) en células de músculo liso de rata. Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos distintos. (** $p < 0.01$ vs. vehículo; $\dagger\dagger p < 0.01$ vs. leptina 100 ng/ml).

Nuestros datos muestran que la leptina es un factor prooxidante y profibrótico en células de músculo liso procedentes de rata adulta, debido a que la leptina es capaz de incrementar tanto la producción de aniones superóxido como de proteínas de matriz extracelular como son el colágeno tipo I y la fibronectina.

El efecto prooxidante de la leptina parece mediar el efecto profibrótico de la misma, ya que el empleo de un antioxidante inespecífico como es la melatonina, es capaz de prevenir la producción tanto de colágeno tipo I como de fibronectina inducida por la leptina. Asimismo, la melatonina reduce los niveles de mediadores profibróticos que se encuentran incrementados por la acción de la leptina en las células de músculo liso como son el TGF- β y el CTGF.

La activación de la vía PI3K/Akt generada por la leptina, parece ser debida a la producción de aniones superóxido. La inhibición de dicha vía genera una reducción en el incremento observado en las células estimuladas con leptina tanto de colágeno tipo I, como de los distintos mediadores profibróticos como son el TGF- β , la galectina-3 y el CTGF.

Discusi3n

Son muchos los estudios que muestran los efectos perjudiciales de la obesidad sobre la salud y especialmente la asociación que existe entre obesidad y el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

La obesidad se caracteriza, entre otras cosas, por una mayor acumulación de tejido adiposo que juega un papel central en distintas patologías como diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares, infarto de miocardio, hipertensión, hiperlipidemia. Por todo ello, el tejido adiposo es considerado como una diana prometidora en patologías relacionadas con la obesidad que incluye la supresión de adipogénesis o de tejido adiposo, la obstrucción de la acumulación de lípidos en los adipocitos y la supresión de adipocitos por apoptosis (Jun et al., 2011; Zhang and Huang, 2012).

En concreto, la obesidad se asocia con alteraciones cardiovasculares que incluyen cambios estructurales tanto en el corazón como en la aorta que finalmente pueden llegar a producir una disfunción cardíaca. Por tanto, se asume que padecer sobrepeso u obesidad durante largos períodos de tiempo puede llegar a generar insuficiencia cardíaca. Los cambios estructurales que se dan en el corazón son varios como por ejemplo una hipertrofia cardíaca donde hay un predominio de la hipertrofia del ventrículo izquierdo de tipo concéntrica. Esta hipertrofia del ventrículo izquierdo puede ser debida a un incremento de la grasa epicárdica y a una mayor infiltración de grasa en el miocardio, a una hipertrofia de los cardiomiocitos y también a una mayor acumulación de colágeno (Iacobellis et al., 2002). Por tanto, cambios en la matriz extracelular pueden generar cambios en la estructura y finalmente en la función cardíaca.

I. Efectos cardiacos de la obesidad mórbida.

Nuestros datos muestran como los individuos que poseen obesidad mórbida tienen la presión arterial tanto sistólica como diastólica alterada. El incremento progresivo de la prevalencia de la obesidad se ha visto acompañada por un incremento en la prevalencia de la hipertensión, y se estima que entre el 60-70% del riesgo de sufrir hipertensión puede ser atribuible a la obesidad (Kotchen, 2010). La presión sanguínea incrementa de manera lineal en función del índice de masa corporal o del perímetro de cintura (Wenzel et al., 2013). Los mecanismos de la aparición de hipertensión relacionada con la

obesidad incluyen resistencia a la insulina, retención de sodio, un incremento en la actividad del sistema nervioso simpático, la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona y una función vascular alterada. En este sentido observamos como el grupo de individuos que padecen obesidad tienen un mayor índice HOMA que muestra la resistencia a la acción de la insulina sufrida por los individuos con obesidad mórbida.

En los individuos obesos se dan importantes cambios en la estructura cardíaca, ya que podemos observar cómo se produce un incremento en el diámetro telediastólico y telesistólico del ventrículo izquierdo, que se acompaña por un incremento en el espesor del septo interventricular, en el de la pared posterior y en el de la masa del ventrículo izquierdo indexada. Está bien establecido que la obesidad se acompaña de cambios en la estructura cardíaca como hipertrofia ventricular (Alpert, 2001; Syed et al., 2009). Estos cambios en la estructura del corazón pueden generar cambios en la función cardíaca.

En cuanto a los datos de función miocárdica, observamos como en los individuos obesos hay una menor fracción de eyección del ventrículo izquierdo, indicándonos la disminución del volumen del ventrículo izquierdo del corazón en sístole, con respecto a la diástole. También hemos detectado anomalías en la función diastólica. La disfunción diastólica en la obesidad mórbida se debe al aumento en el flujo sanguíneo y en el volumen circulante, junto con hipertrofia ventricular. Actualmente, el mecanismo molecular subyacente no se conoce con exactitud, aunque se ha señalado al papel de la resistencia a la insulina en la recaptación del calcio desde el retículo endoplasmático (Jain et al., 1996).

En el grupo de individuos obesos se observa un importante incremento en varios parámetros circulantes como la leptina, a la cual se le han atribuido efectos deletéreos sobre el sistema cardiovascular, GLP`-1, MMP-9, factores de daño oxidativo en el corazón como la MPO y distintos mediadores de inflamación. Del mismo modo encontramos valores reducidos de adiponectina, a la cual se le han atribuido efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular. Durante la obesidad se producen cambios en el tejido adiposo, el cual se caracteriza por un incremento en la infiltración de macrófagos y una mayor secreción de distintas adipocinas como la leptina y de distintas citoquinas como las observadas en el grupo de individuos obesos (Hall et al., 2010; Dorresteijn et al., 2012).

Debido a estos importantes cambios encontrados y mediante un estudio de regresión lineal, observamos como la leptina y el TNF- α , son las dos variables con mayor significación que justifican la disfunción diastólica observada en los individuos obesos. Por ello decidimos desarrollar un modelo animal de obesidad inducido por dieta, con el fin de estudiar los cambios principalmente estructurales generados no solo en corazón, sino también en aorta y explorar los posibles mecanismos involucrados.

Los principales componentes de la matriz extracelular se describen a menudo como estructurales (como por ejemplo el colágeno y fibras elásticas) y adhesivos (como por ejemplo la fibronectina y la laminina). La regulación del colágeno es llevada a cabo por la familia de las metaloproteinasas (Fedak et al., 2005a; Fedak et al., 2005b; Graham et al., 2008), pero en el remodelado, no solo está implicada la alteración de los niveles totales de colágeno, sino que también el tipo de colágeno, la organización y el entrecruzamiento de ese colágeno es muy importante (Whittaker, 1995). El colágeno es el principal elemento que se encuentra sometido a estrés dentro de la matriz extracelular y forma una red tridimensional alrededor de paquetes de miocitos para generar una red tolerante al estrés.

II. Efectos cardiacos de la obesidad inducida por dieta en rata.

Nuestros datos muestran como los animales con obesidad inducida por dieta, en los cuales no hay modificaciones en la presión arterial ni modificaciones en ninguno de los parámetros estudiados sobre la función cardiaca, muestran un remodelado tanto a nivel cardiaco como a nivel vascular. Este remodelado se caracteriza principalmente por cambios en la matriz extracelular donde observamos un incremento en los niveles de colágeno total.

A nivel cardiaco, el grupo de animales OB muestra importantes cambios en la estructura del corazón que son previos a la aparición de cambios en la función cardiaca. A pesar de no encontrar cambios en el área de los cardiomicitos observamos como existe un incremento en el área de la arteria coronaria descendente que es debida principalmente a que existe un aumento en el área de la media de dicha arteria. Junto con estos cambios, los animales alimentados con la dieta rica en grasa muestran un incremento en la fibrosis intersticial. La fibrosis cardiaca se caracteriza por una

acumulación de matriz extracelular siendo un proceso que ocurre en la mayoría de los estados patológicos cardiacos (Berk et al., 2007). Esta fibrosis intersticial se asocia con un mayor porcentaje de colágeno no soluble frente a colágeno soluble, lo cual muestra un mayor entrecruzamiento de las fibras de colágeno, y por tanto una mayor estabilidad de la matriz extracelular, siendo más complicada su degradación.

El incremento en los niveles de colágeno total que ocurre en el corazón de los animales obesos parece ser debido en parte a un incremento en los niveles de colágeno I junto con una menor degradación del mismo como se observa al ver los niveles reducidos de MMP-2, pero no de uno de sus inhibidores como es el TIMP-2. Hay estudios que muestran como alteraciones en la red de colágeno pueden llegar a generar disfunción cardiaca (Janicki and Brower, 2002).

Asimismo, el incremento en los niveles de colágeno I parece ser mediado por distintos factores profibróticos como son el TGF- β y la galectina-3. El TGF- β es una citoquina profibrótica que ha mostrado ejercer acciones tanto profibróticas como hipertróficas y se ha asociado a fibrosis tanto en corazón como en riñón (Lim and Zhu, 2006; Border and Noble, 1995). Esta citoquina es capaz de mediar la fibrosis mediante la estimulación de la producción de la matriz extracelular además de ser capaz de disminuir su degradación. La expresión de mRNA de TGF- β se ha visto incrementada en el ventrículo izquierdo de pacientes con cardiomiopatía hipertrófica (Hein et al., 2003; Li et al., 1997) o con cardiomiopatía idiopática dilatada (Pauschinger et al., 1999).

La galectina-3, es una proteína que pertenece a la familia de las lectinas la cual se ha propuesto que interacciona con numerosos ligandos como receptores de la membrana celular (integrinas) y con proteínas de la matriz extracelular (colágeno, elastina, fibronectina) (Ochieng et al., 2004). La expresión de galectina-3 se ha descrito en numerosos tejidos incluyendo en el miocardio (Kim et al., 2007), y en numerosas estirpes celulares como en fibroblastos (Sharma et al., 2004a), células endoteliales (Thijssen et al., 2008; Wan et al., 2011), y células inflamatorias como macrófagos (Papaspnyridonos et al., 2008a). La galectina-3 tiene un papel central en numerosas patologías mediante la amplificación de moléculas proinflamatorias (Papaspnyridonos et al., 2008). Asimismo, se han encontrado asociaciones de galectina-3 con disfunción

cardiaca a través de la inducción de la proliferación de cardiofibroblastos, la deposición de colágeno y la disfunción ventricular (Sharma et al., 2004b; de Boer et al., 2009).

Del mismo modo, junto con el proceso fibrótico observado en el corazón de los animales con obesidad inducida por dieta, encontramos un incremento en los niveles cardiacos de leptina que a su vez se correlacionan tanto con los niveles de colágeno total, junto con los niveles de colágeno I, TGF- β e inversamente con los niveles de MMP-2. Esta correlación encontrada sugiere el posible papel que juega la leptina en el remodelado cardiaco observado en los animales obesos.

Durante los últimos años, estudios tanto clínicos como experimentales han generado evidencias sustanciales de que existe un incremento de estrés oxidativo, definido como un exceso de especies reactivas de oxígeno (EROs) frente a la defensa antioxidante, en diferentes enfermedades cardiovasculares. Excesivas EROs generan una disfunción celular, peroxidación lipídica, y daño al ADN que puede generar daños irreversibles en las células provocando finalmente muerte celular (Tsutsui et al., 2011). En concreto, las EROs, afectan directamente a la función contráctil del corazón mediante la modificación de proteínas clave en el acoplamiento excitación-contracción (Zima and Blatter, 2006). Existen estudios que muestran que individuos que sufrieron un infarto agudo de miocardio se encontró un déficit en la defensa antioxidante además de un incremento en el estrés oxidativo (Hill and Singal, 1997). También existen estudios que muestran como las EROs estimulan la producción de matriz extracelular en cardiofibroblastos a través de la activación de distintas vías de señalización (Yu et al., 2012; Shyu et al., 2012). Esta relación estrés oxidativo-matriz extracelular se ve apoyada por el hecho de que la reducción del estrés oxidativo es capaz de reducir la fibrosis cardiaca en diferentes modelos de cardiopatías (Khong et al., 2011; Liu et al., 2010). En relación con estos estudios, observamos que en el corazón de los animales que recibieron la dieta con alto contenido en grasa además de mostrar un incremento en la fibrosis cardiaca, también muestran un mayor estrés oxidativo valorado por la presencia de aniones superóxido.

Por tanto, los datos encontrados en el corazón de las ratas obesas, muestran como la fibrosis y el estrés oxidativo son eventos tempranos que aparecen previos a cualquier cambio en la función cardiaca y el incremento encontrado en los niveles cardiacos de leptina podría jugar un papel central en ambos procesos.

III. Efectos vasculares de la obesidad inducida por dieta en rata.

A nivel vascular también encontramos importantes modificaciones en los animales que recibieron la dieta con alto contenido en grasa que son previos a cambios en la función vascular. En la aorta de estos animales encontramos un incremento tanto en el área de la media como en el grosor de la pared de la aorta. Asimismo, observamos un incremento en el contenido de proteínas celulares así como un incremento de peso seco de la aorta, mostrando hipertrofia de la aorta. Estas alteraciones morfológicas se acompañan por un incremento de proteínas de la matriz extracelular como es el colágeno y la fibronectina en ausencia de modificaciones en los niveles de elastina. Estos datos apoyan el aumento de la rigidez de la pared arterial que se han observado en animales obesos, cambio que puede ser predictivo de aumento de la mortalidad cardiovascular (Laurent et al., 2005; Redon et al., 2009). De acuerdo con estos datos, y de manera independiente de la presencia de otros factores de riesgo como la hipertensión y como la diabetes, pacientes obesos presentan un incremento en el ratio media-lumen y en el área de pequeñas arterias de resistencia subcutáneas (Grassi et al., 2010). Por tanto la obesidad se asocia con un remodelado vascular que se caracteriza por cambios en el diámetro de vasos sanguíneos debido a que hay un desequilibrio en la degradación y en la deposición de la matriz extracelular.

Esta fibrosis vascular se asocia con un mayor porcentaje de colágeno no soluble frente a colágeno soluble, lo cual muestra un mayor entrecruzamiento de las fibras de colágeno, y por tanto una mayor estabilidad de la matriz extracelular, siendo más complicada su degradación.

El incremento en los niveles de colágeno total que ocurre en el vaso de los animales obesos parece ser debido en parte a un incremento en los niveles de colágeno I junto con una menor degradación del mismo como se observa al ver los niveles reducidos de MMP-2, pero no de uno de sus inhibidores como es el TIMP-2.

De manera paralela, observamos en la aorta de estos animales alimentados con la dieta rica en grasa un incremento en los niveles de distintos mediadores profibróticos como son el TGF- β y el CTGF los cuales podrían estar mediando el incremento en los niveles de colágeno I anteriormente mencionados. El TGF- β ha sido descrito como uno de los principales reguladores de la matriz extracelular y juega un papel muy importante

en el mantenimiento de la estructura del vaso controlando el balance entre inflamación y la deposición de matriz extracelular (Ruiz-Ortega et al., 2007a).

El CTGF, también conocido como CCN2, es una proteína de bajo peso molecular rica en cisteína (Perbal, 2004a). Sus propiedades reguladoras se expresan en respuesta a otros factores de crecimiento, como el TGF- β , a situaciones de hipoxia, a estrés oxidativo y a deformaciones mecánicas (de et al., 2008a). El CTGF tiene un papel importante en la formación de tejidos conectivos y en la angiogénesis (Perbal, 2004b; de et al., 2008b; Ivkovic et al., 2003). Tanto en estudios con modelos animales, como en estudios celulares, se ha visto que la adición de CTGF recombinante o su sobreexpresión genera aumentos en la síntesis de colágeno tipo I, permitiendo finalmente la aparición de fibrosis (Abraham, 2008).

El hecho de no encontrar ninguna modificación en los niveles de galectina-3 entre las ratas alimentadas con una dieta rica en grasa y las alimentadas con la dieta estándar sugiere que la galectina-3 no es un mediador común de fibrosis como pueden ser el TGF- β y el CTGF y le confiere a la galectina-3 una cierta especificidad. Debido a ello, podemos observar el cambio en el comportamiento de la galectina-3 entre el corazón y la aorta. En este sentido, un estudio reciente, muestra el papel central que juega la galectina-3 en la fibrosis vascular inducida por aldosterona. En este estudio muestra como la aldosterona genera tanto un remodelado, como un incremento en los componentes de la ECM, efecto que desaparece con el bloqueo de la galectina-3 (Calvier et al., 2013).

Al igual que ocurre en el corazón de las ratas obesas, observamos un incremento en los niveles de leptina aórtica, que además se correlaciona con los niveles de colágeno total, colágeno I, TGF- β y CTGF, e inversamente con los niveles de MMP-2. Esta correlación encontrada sugiere el posible papel que juega la leptina en el remodelado cardiaco observado en los animales obesos.

De manera paralela al incremento de aniones superóxido que encontramos en el corazón de las ratas que recibieron la dieta con alto contenido en grasa, encontramos de nuevo un incremento de estrés oxidativo en la aorta de dichos animales como observamos por la mayor presencia de aniones superóxido.

Por tanto, los datos encontrados en la aorta de las ratas obesas, muestran como la fibrosis y el estrés oxidativo son eventos tempranos que aparecen previos a cualquier cambio en la función vascular y el incremento encontrado en los niveles vasculares de leptina podría jugar un papel central en ambos procesos.

IV. Efectos directos de la leptina en cardiomioblastos procedentes de rata adulta.

Dada la correlación que existe entre leptina-fibrosis-estrés oxidativo que ocurre a nivel cardiaco en las ratas obesas, decidimos explorar los posibles efectos directos de la leptina sobre la síntesis de componentes de la ECM y sobre la producción de aniones superóxido. Para este propósito, estudiamos los efectos directos de la leptina en un modelo *in vitro*.

Una de las principales estirpes celulares que regulan la producción de la matriz extracelular en el corazón son los cardioblastos. Debido a ello, la importancia de estas células se extiende mucho más allá de ser simples reguladores de la producción de matriz extracelular. Estas células juegan un papel central no solo en la función normal del miocardio, sino también en el remodelado que ocurre en respuesta a distintos cambios patológicos, como la hipertensión, el infarto de miocardio y el fallo cardiaco (Porter and Turner, 2009a) ya que alteraciones en la composición y la estructura de la ECM pueden contribuir a cambios tanto en el tamaño, como en la estructura y en la función cardiaca y vascular (Schram and Sweeney, 2008).

El estudio de la caracterización celular, muestra como nuestras células, ya desde un primer pase, están diferenciadas a cardiomioblastos ya que son capaces de expresar tanto vimentina como fibras de estrés (α -SMA). La principal diferencia de estas células frente a los cardioblastos es que tienen una mayor capacidad de expresar proteínas contráctiles y exhiben mayores propiedades migratorias, proliferativas y secretoras. La diferenciación de cardioblastos a cardiomioblastos puede ser originada por distintas causas, pero las principales son el TGF- β y el estrés mecánico generado en la propia disociación de las células (Porter and Turner, 2009).

En los cardiomioblastos procedentes de rata adulta, la leptina fue capaz de incrementar, a dosis encontradas en individuos obesos (100 ng/ml), la síntesis de

colágeno I. Estos datos confirman otros estudios que muestran como la leptina es capaz de estimular colágeno en cardiofibroblastos procedentes de ratón (Zibadi et al., 2011) y de ratas neonatales (Schram et al., 2008). De hecho, la administración de leptina en ratones *ob/ob* generó un incremento en el contenido de colágeno cardiaco.

Junto con el incremento de colágeno generado por la leptina en los cardiomiocitos, la leptina generó un descenso en la actividad de MMP-2, independientemente de la concentración de leptina utilizada. En este sentido existe controversia, ya que otros autores muestran como la leptina es capaz de incrementar la actividad de la MMP-2 en cardiofibroblastos procedentes de rata adulta (Schram et al., 2008). Estas discrepancias encontradas pueden ser debidas al cambio en los comportamientos de las células, debido entre otras cosas, al tiempo de adaptación de las células al estímulo. Debido a ello, en un primer lugar, el incremento en la actividad de las MMP-2 puede ser una respuesta compensatoria temprana al incremento en la síntesis de colágeno I, que posteriormente fracasa y por ello se genera una reducción en la actividad de las metaloproteinasas.

Nuestros estudios, junto con los mencionados anteriormente muestran a la leptina como un agente profibrótico en el corazón. El incremento en la síntesis de colágeno I parece ser debido a la capacidad de la leptina de incrementar la síntesis de distintos factores profibróticos como son la galectina-3, el TGF- β y el CTGF en los cardiomiocitos procedentes de rata adulta. Estos resultados son similares a los encontrados en el corazón de las ratas obesas, mostrando la posible implicación de la leptina en el proceso fibrótico observado en el corazón de dichos animales.

No existen muchos estudios que muestren la relación que existe entre leptina y TGF- β . En ratas diabéticas, se ha comprobado como niveles plasmáticos elevados de leptina se acompañaron por un incremento en la expresión de TGF- β en el ventrículo izquierdo y con un incremento en la fibrosis perivascular coronaria (Chen et al., 2007; Yu et al., 2004). Parece que el TGF- β , actúa a través de la sobreexpresión de CTGF (Miana et al., 2011; Ruiz-Ortega et al., 2007). El incremento en la expresión de TGF- β por la acción de la leptina aparece a las 12 horas de estimulación, mientras que el incremento en la expresión de CTGF aparece a las 24 horas junto con la de colágeno I. Por ello, la leptina desencadena la señalización de TGF- β , incrementando la expresión de CTGF y generando el incremento en la síntesis de colágeno I.

A pesar de que no podemos descartar la implicación del CTGF en los primeros estadios de la fibrosis cardiaca, parece que el CTGF no tiene un papel central a largo plazo en la fibrosis desarrollada en los animales obesos debido a que en el corazón de los animales alimentados con la dieta rica en grasa no encontramos modificaciones en los niveles de CTGF en comparación con las ratas alimentadas con la dieta estándar.

No existen estudios que muestren la relación entre leptina y galectina-3. Nuestros datos muestran como la galectina-3 media los efectos de la leptina en cardiomioblastos procedentes de rata adulta. Esto es debido a que la leptina genera incrementos en la galectina-3, y a que el pretratamiento con un inhibidor de la actividad de la galectina-3 como es el LACNAC, es capaz de prevenir la síntesis de colágeno I inducida por la leptina. Asimismo, también observamos una interacción entre EROs y galectina-3, ya que la inhibición de la actividad de la galectina-3, se acompañó por una reducción del estrés oxidativo generado por la leptina en los cardiomioblastos. En este sentido, existen estudios que muestran como la galectina-3 puede estimular la producción de estrés oxidativo en neutrófilos y macrófagos procedentes de ratón (Fernandes Bertocchi et al., 2008; Alves et al., 2013).

La estimulación de los cardiomioblastos con leptina, generó un incremento de manera dosis-dependiente de la producción de aniones superóxido, mostrando a la leptina como un factor prooxidante. Esta afirmación no solo se ha visto en cardiomioblastos, ya que también se ha visto este efecto de la leptina en células endoteliales y en células hepáticas (Yamagishi et al., 2001; He et al., 2010). De hecho, los niveles de leptina plasmáticos se han correlacionado con la actividad de la NADPH oxidasa en pacientes obesos (Fortuno et al., 2010). Esta acción prooxidante ejercida por la leptina es capaz de modular el efecto fibrótico de la misma, debido a que el pretratamiento con un antioxidante inespecífico como es la melatonina (Reiter and Tan, 2002; Kim et al., 2001) es capaz de prevenir la inducción de colágeno I en las células tratadas con leptina. Por el contrario, la melatonina no fue capaz de prevenir el descenso en la actividad de la MMP-2 generado por la leptina. El pretratamiento con melatonina no solo fue capaz de prevenir la síntesis de colágeno I, sino que también fue capaz de prevenir el incremento en la síntesis de los factores profibróticos mencionados anteriormente como son la galectina-3, el TGF- β y el CTGF.

Estos efectos prooxidantes de la leptina en cardiomioblastos procedentes de rata adulta, se asocian con el incremento en la presencia de aniones superóxido observado en el corazón de las ratas obesas.

La leptina en los cardiomioblastos también es capaz de incrementar la fosforilación y por tanto su activación del p70S6K, uno de los mediadores de la vía mTOR. Debido a esta activación, quisimos comprobar el papel que juega dicha vía en los efectos generados por la leptina. Para este propósito, pretratamos los cardioblastos con la rapamicina, un inhibidor de la vía mTOR. El pretratamiento con rapamicina fue capaz de prevenir la síntesis tanto de colágeno, como de los factores profibróticos galectina-3, TGF- β y CTGF inducida por la leptina. La activación de esta vía se asocia con fibrosis cardíaca en diferentes patologías cardíacas (Yu et al., 2013; Vilahur et al., 2011; Aoyagi et al., 2012). La presencia de rapamicina también fue capaz de prevenir el incremento en la producción de aniones superóxido generado por la leptina. Por el contrario, la presencia de melatonina no fue capaz de prevenir la fosforilación del p70S6K, indicando la relación que existe entre el estrés oxidativo y la vía mTOR. Esta conexión entre EROs y mTOR en la generación de fibrosis cardíaca ya ha sido descrita en la producción de matriz extracelular tras infarto de miocardio y en ratas con hipertrofia del ventrículo izquierdo (Xu et al., 2008; Schenkel et al., 2010; Schenkel et al., 2012). También existen varios estudios que muestran la relación que existe entre mTOR y leptina. De este modo se han descrito una relación entre mTOR y leptina en hipertrofia de cardiomiocitos, hiperplasia neointimal, el control del balance de energía así como en la regulación del metabolismo lipídico y de la inflamación (Zeidan et al., 2011; Rodriguez et al., 2011; Maya-Monteiro and Bozza, 2008; Shan et al., 2008). Por todo ello, nuestros datos muestran una relación entre mTOR-leptina que se extiende a los efectos fibróticos del corazón, apoyando la idea de que esta vía tiene un papel importante en la señalización celular de las acciones de la leptina.

Por tanto, nuestros datos muestran a la leptina como un factor profibrótico en cardiomioblastos procedentes de rata adulta debido a que es capaz de incrementar la síntesis de colágeno I y a disminuir su degradación. Este efecto fibrótico es mediado por el efecto oxidativo de la leptina que es debido en parte a la activación de la vía mTOR. A su vez, la galectina-3 emerge como un mediador de los efectos fibróticos de la leptina junto con el TGF- β , y el CTGF.

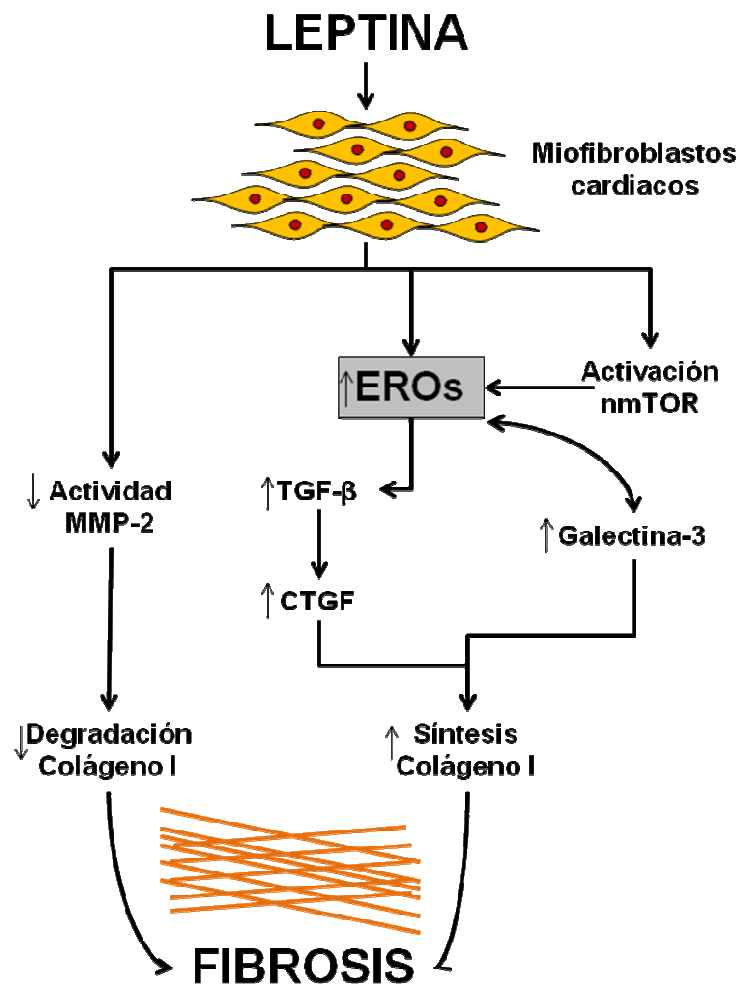


Figura 67: Esquema ilustrativo de los mecanismos involucrados en el efecto fibrótico inducido por la leptina en cardiomioblastos de rata adulta. La leptina favorece la deposición de colágeno mediante la modulación tanto de su síntesis como de su degradación. La leptina induce la síntesis de colágeno mediante el incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) de manera directa o a través de la activación de mTOR. La galectina-3 y factores de crecimiento como el TGF- β y el CTGF parecen ser los mediadores finales de la síntesis de colágeno inducida por la leptina. El descenso en la actividad de la MMP-2 generada por la leptina es debida a mecanismos independientes del estrés oxidativo y de la vía mTOR.

V. Efectos directos de la leptina en células de músculo liso procedentes de rata adulta.

Dada la correlación que existe entre leptina-fibrosis-estrés oxidativo que ocurre a nivel vascular en las ratas obesas, decidimos explorar los posibles efectos directos de la leptina sobre la síntesis de componentes de

la ECM y sobre la producción de aniones superóxido. Para este propósito, estudiamos los efectos directos de la leptina en un modelo *in vitro*.

Las células de músculo liso vascular son el principal tipo de células que se encuentran en la capa media de los vasos sanguíneos, contribuyendo de manera activa a la fisiopatología vascular. Estas células son capaces de producir componentes de la matriz extracelular, proporcionando a la pared arterial la capacidad de resistir las altas presiones de la circulación sanguínea. Un incremento excesivo en la síntesis de colágeno y la hipertrofia de las células de músculo liso genera un aumento de la rigidez arterial que es predictivo de un aumento de la mortalidad cardiovascular (Osborne-Pellegrin et al., 2010). Debido a ello, la importancia de estas células se extiende mucho más allá de ser simples reguladores de la producción de matriz extracelular (Lacolley et al., 2012). Estas células juegan un papel central no solo en la función vascular normal, sino también en el remodelado vascular que ocurre en respuesta a distintos cambios patológicos, como la hipertensión y la aterosclerosis entre otros.

En las células de músculo liso procedentes de rata adulta, la leptina fue capaz de incrementar, a dosis encontradas en individuos obesos (100 ng/ml), ciertos componentes de la matriz extracelular debido a que la leptina fue capaz de incrementar la síntesis de colágeno I y de fibronectina, pero no de colágeno III ni de elastina. El incremento observado en colágeno I y en fibronectina sin cambios en componentes de la matriz extracelular responsables de las propiedades elásticas de las mismas (colágeno III y elastina) (Diez, 2007; Lacolley et al., 2002), claramente sugiere una rigidez de la matriz y en consecuencia el papel de la leptina en la rigidez arterial observada en las ratas obesas. En este sentido, elevados niveles circulantes de leptina se han asociado con una peor distensibilidad arterial en adolescentes sanos. Esta asociación fue independiente de otros factores como la grasa corporal, la presión sanguínea y la resistencia a la insulina (Singhal et al., 2002).

Considerando que este incremento en la matriz extracelular podría participar en el engrosamiento de la media observado en la aorta de las ratas obesas, nuestros datos generan la idea de que la leptina no es solo un inductor de fibrosis, sino que también juega un papel central en el remodelado vascular asociado a obesidad.

El incremento en la síntesis de colágeno I generado por la leptina en las células de músculo liso, parece ser mediado por factores profibróticos como el TGF- β y el CTGF.

En estas células la leptina no fue capaz de modificar la expresión de galectina-3 mostrando la especificidad de este factor profibrótico mencionado anteriormente. Asimismo, existen algunos datos que muestran como el TGF- β y el CTGF son capaces de estimular la síntesis de fibronectina en diferentes estirpes celulares (Li et al., 2013).

A diferencia de en los cardiomiocitos, la leptina en las células de músculo liso genera un incremento en la actividad de distintas metaloproteinasas como son la MMP-2, MMP-9 y MMP-13. Este efecto puede ser debido a un efecto inicial para intentar compensar el incremento en la síntesis de colágeno I.

La vía PI3K/Akt media los efectos fibróticos generados por la leptina en las células de músculo liso. Esta afirmación se basa en que la leptina es capaz de incrementar la fosforilación, y por tanto la activación de Akt. Además la presencia de un inhibidor específico de esta vía como es el LY294002 fue capaz de prevenir la producción de colágeno I, fibronectina y los mediadores profibróticos inducidos por la leptina. Ya ha sido descrita la interacción entre leptina y la vía PI3K/Akt en los efectos fibróticos de la leptina generados en células hepáticas (Zhou et al., 2009), además de en el control de la ingesta de alimentos y del balance energético (Donato, Jr. et al., 2010). Por tanto, estos datos muestran como la vía PI3K/Akt actúa como una vía general involucrada en las acciones de la leptina.

El papel que juega la vía PI3K/Akt sobre las acciones de la leptina es mediado por el estrés oxidativo que ejerce la leptina en las células de músculo liso. Esto es debido a que la presencia de un antioxidante inespecífico como es la melatonina previene la fosforilación de Akt. Asimismo, la leptina a tiempos cortos de estimulación (6 horas) genera un incremento en la producción de aniones superóxido que el inhibidor de la vía PI3K/Akt, el LY294002, no es capaz de prevenir. De acuerdo con estas observaciones, existen estudios que han mostrado la interacción entre EROs y la activación de la vía PI3K/Akt en diferentes condiciones experimentales (Urtasun et al., 2012).

El incremento de aniones superóxido generado por la leptina ocurre al mismo tiempo en el que se observa una inducción de la expresión génica de colágeno I y fibronectina. El hecho de que a las 24 horas de estimulación con leptina no encontramos modificaciones en la producción de aniones superóxido sugiere que la inducción de EROs por parte de la leptina sigue un patrón dependiente del tiempo de estimulación. La pretratamiento de melatonina en las células de músculo liso estimuladas con leptina

fue capaz de prevenir la producción de colágeno I, fibronectina y los mediadores profibróticos inducidos por la leptina, mostrando el papel que juega el estrés oxidativo sobre las acciones fibróticas de la leptina en las células de músculo liso procedentes de rata adulta.

Por tanto, nuestros datos muestran a la leptina como un factor profibrótico en células de músculo liso procedentes de rata adulta debido a que es capaz de incrementar la síntesis de colágeno I y de fibronectina. Este efecto fibrótico es mediado por la activación de la vía PI3K/Akt, que a su vez es mediado por el efecto oxidativo generado por la leptina. A su vez, TGF- β , y el CTGF median los efectos fibróticos de la leptina.

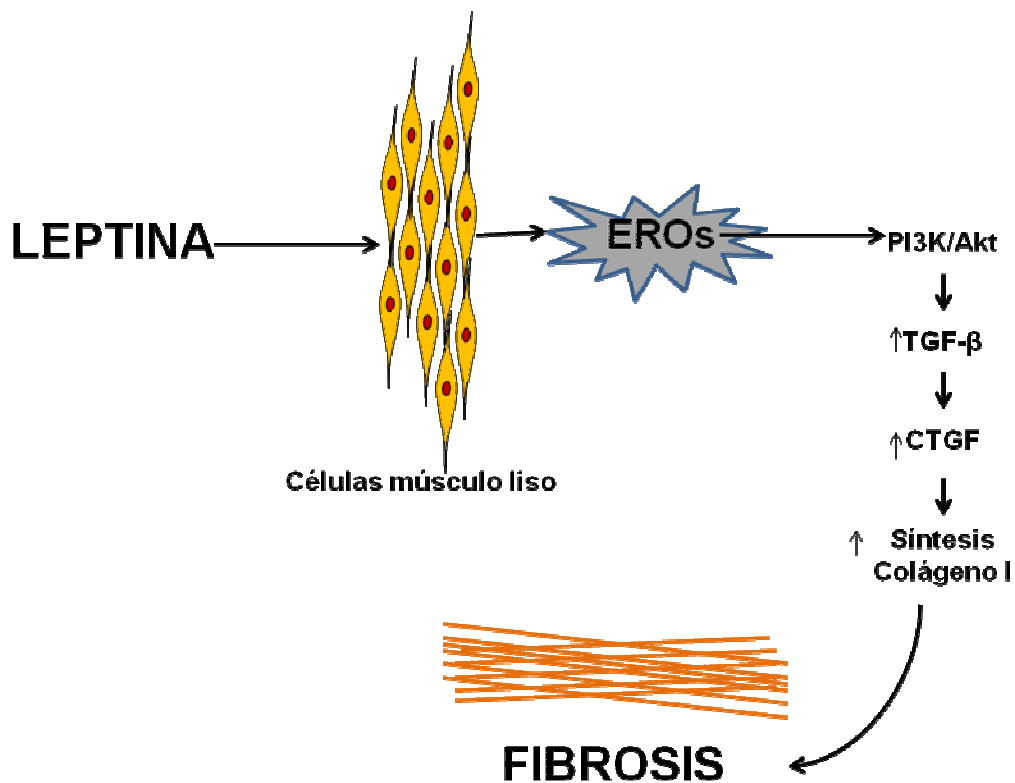


Figura 67: Esquema ilustrativo de los mecanismos involucrados en el efecto fibrótico inducido por la leptina en células de músculo liso de rata adulta. La leptina favorece la deposición de colágeno mediante la modulación de su síntesis. La leptina induce la síntesis de colágeno mediante el incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de la activación de la vía PI3K/Akt. Factores de crecimiento como el TGF- β y el CTGF parecen ser los mediadores finales de la síntesis de colágeno inducida por la leptina.

Conclusiones

1. En individuos obesos mórbidos, existe un cambio en el patrón geométrico ventricular a expensas fundamentalmente de hipertrofia excéntrica.
2. En individuos obesos mórbidos existe disfunción diastólica que es independiente de las condiciones hemodinámicas de carga.
3. El patrón geométrico ventricular en individuos obesos mórbidos está determinado por la presencia de leptina y de la propia obesidad.
4. La disfunción diastólica en individuos obesos mórbidos está determinada fundamentalmente por los niveles circulantes de leptina, así como los niveles de TNF- α y la presencia de hipertrofia ventricular.
5. La obesidad se asocia con cambios estructurales en el sistema cardiovascular caracterizados principalmente por un incremento de fibrosis intersticial a expensas de colágeno no soluble. Estos cambios estructurales se producen de manera temprana y son previos a la aparición de cambios funcionales.
6. La hiperleptinemia observada en los animales obesos se acompaña con un incremento en los niveles locales de leptina a nivel cardiaco y vascular.
7. La leptina participa en la fibrosis cardiaca y vascular a través de la acción prooxidante de la misma y de la consecuente activación de la vía PI3K/Akt/mTOR.
8. La galectina-3 modula las acciones profibróticas y prooxidantes de la leptina a nivel cardiaco.

Conclusions

1. In morbidly obese individuals, there is a change in ventricular geometric pattern primarily due to excentric hypertrophy.
2. In morbidly obese individuals, there is diastolic dysfunction which is independent of hemodynamic load conditions.
3. Ventricular geometric pattern in morbidly obese individuals is determined by the presence of leptin and the obesity itself.
4. Diastolic dysfunction in morbidly obese individuals is determined primarily by circulating leptin levels, as well as TNF- α levels and the presence of ventricular hypertrophy.
5. In a model of diet-induced obesity is associated with structural changes in the cardiovascular system characterized mainly by an increase in interstitial fibrosis due to unsoluble collagen. These structural changes appear early on and occur prior to the appearance of functional changes.
6. The hyperleptinemia observed in obese animals is accompanied by a rise in local leptin levels at cardiac and vascular levels.
7. Leptin participates in cardiac and vascular fibrosis through a prooxidant action and consequent activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway.
8. Galectin-3 modulates the profibrotic and prooxidant effects of leptin at cardiac level in obese animals.

Bibliografía

- Abel ED, Sweeney G. 2012 Oct. Modulation of the cardiovascular system by leptin. *Biochimie* 94(10):2097-2103.
- Abraham D. 2008 Oct. Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc?. *Rheumatology (Oxford)* 47 Suppl 5:v8-v9.
- Ahima RS, Flier JS. 2000a. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413-437.
- Ahima RS. 2006 Aug. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:242S-249S.
- Ahren B, Mansson S, Gingerich RL, Havel PJ. 1997 Jul. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. *Am J Physiol* 273(1 Pt 2):R113-R120.
- Ajuwon KM, Spurlock ME. 2005 Aug. Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 135(8):1841-1846.
- Alexander JK. 1985 Mar. The cardiomyopathy of obesity. *Prog Cardiovasc Dis* 27(5):325-334.
- Alpert MA, Lambert CR, Panayiotou H, Terry BE, Cohen MV, Massey CV, Hashimi MW, Mukerji V. 1995 Dec. Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am J Cardiol* 76(16):1194-1197.
- Alpert MA, Terry BE, Mulekar M, Cohen MV, Massey CV, Fan TM, Panayiotou H, Mukerji V. 1997 Sep. Cardiac morphology and left ventricular function in normotensive morbidly obese patients with and without congestive heart failure, and effect of weight loss. *Am J Cardiol* 80(6):736-740.
- Alpert MA. 2001 Apr. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 321(4):225-236.
- Alves CM, Silva DA, Azzolini AE, Marzocchi-Machado CM, Lucisano-Valim YM, Roque-Barreira MC, Mineo JR. 2013 Feb. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 140(2):210-219.
- Aoyagi T, Kusakari Y, Xiao CY, Inouye BT, Takahashi M, Scherrer-Crosbie M, Rosenzweig A, Hara K, Matsui T. 2012 Jul. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(1):H75-H85.

- Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini F, Bosello O, Lechi A. 1999 Sep. Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23(9):936-942.
- Atkinson LL, Fischer MA, Lopaschuk GD. 2002 Aug. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J Biol Chem* 277(33):29424-29430.
- Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, Segerson N, Adams TD, Gress RE, Hunt SC, Litwin SE. 2007 Jana. Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension* 49(1):34-39.
- Bahary N, Leibel RL, Joseph L, Friedman JM. 1990 Nov. Molecular mapping of the mouse db mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21):8642-8646.
- Banks WA, Farrell CL. 2003 Jul. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1):E10-E15.
- Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. 2003 Aug. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation* 108(6):754-759.
- Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr. 2003 Feb. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421(6925):856-859.
- Belin de Chantemele EJ, Mintz JD, Rainey WE, Stepp DW. 2011 Aug. Impact of leptin-mediated sympatho-activation on cardiovascular function in obese mice. *Hypertension* 58(2):271-279.
- Beltowski J. 2006 Nov. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 189(1):47-60.
- Bergman RN. 2012 Jun. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring)* 20(6):1135.
- Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. 2007 Mar. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 117(3):568-575.
- Berkalp B, Cesur V, Corapcioglu D, Erol C, Baskal N. 1995 Nova. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol* 52(1):23-26.

- Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG, Jr., Flier JS. 2001 Feb. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 276(7):4747-4755.
- Bjorbaek C, Uotani S, da SB, Flier JS. 1997 Deca. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272(51):32686-32695.
- Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT. 2002 Apr. Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *JAMA* 287(13):1706-1709.
- Border WA, Noble NA. 1995 Aug. Fibrosis linked to TGF-beta in yet another disease. *J Clin Invest* 96(2):655-656.
- Boudina S, Abel ED. 2007 Jun. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115(25):3213-3223.
- Brower AC. 1990 Jul. Appendicular arthropathy. *Orthop Clin North Am* 21(3):405-422.
- Brown AM, Mayfield DK, Volaufova J, Argyropoulos G. 2001 Oct. The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. *Gene* 277(1-2):231-238.
- Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED. 2005 Deca. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146(12):5341-5349.
- Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P, Lopez-Andres N. 2013 Jan. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(1):67-75.
- Carley AN, Semeniuk LM, Shimoni Y, Aasum E, Larsen TS, Berger JP, Severson DL. 2004 Mar. Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPARgamma agonist improves cardiac metabolism but not contractile function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(3):E449-E455.
- Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani JP, Mizelle HL. 1999 Mar. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension* 33(3):811-815.
- Catalucci D, Latronico MV, Ellingsen O, Condorelli G. 2008. Physiological myocardial hypertrophy: how and why?. *Front Biosci* 13:312-324.

- Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. 2002 Jul. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes* 51(7):2105-2112.
- Chavey C, Lazennec G, Lagarrigue S, Clape C, Iankova I, Teyssier J, Annicotte JS, Schmidt J, Matakci C, Yamamoto H, Sanches R, Guma A, Stich V, Vitkova M, Jardin-Watelet B, Renard E, Strieter R, Tuthill A, Hotamisligil GS, Vidal-Puig A, Zorzano A, Langin D, Fajas L. 2009 Apr. CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab* 9(4):339-349.
- Chen Y, Ohmori K, Mizukawa M, Yoshida J, Zeng Y, Zhang L, Shinomiya K, Kosaka H, Kohno M. 2007 Jan. Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type II diabetes. *Circ J* 71(1):144-152.
- Cho E, Manson JE, Stampfer MJ, Solomon CG, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hu FB. 2002 Jul. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease among diabetic women. *Diabetes Care* 25(7):1142-1148.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. 2003 May. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289(19):2560-2572.
- Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, Nielsen LB. 2003 Aug. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144(8):3483-3490.
- Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. 1996 Feb. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271(5251):994-996.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. 2005 Nov. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46(11):2347-2355.
- Cinti S. 2005 Jul. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(1):9-15.
- Clark K. 2003. Obesity and the risk of heart failure. *J Insur Med* 35(1):59-60.

- Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Anderson JL. 2003 Aug. Left ventricular hypertrophy is a common echocardiographic abnormality in severe obstructive sleep apnea and reverses with nasal continuous positive airway pressure. *Chest* 124(2):594-601.
- Darvall KA, Sam RC, Silverman SH, Bradbury AW, Adam DJ. 2007 Feb. Obesity and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 33(2):223-233.
- de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. 2009 Sep. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 11(9):811-817.
- de FS, Mozaffarian D. 2008 Jun. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54(6):945-955.
- de Jongh RT, Serne EH, IJzerman RG, de VG, Stehouwer CD. 2004 Jun. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation* 109(21):2529-2535.
- de Kreutzenberg SV, Puato M, Kiwanuka E, Del PS, Pauletto P, Pasini L, Tiengo A, Avogaro A. 2003 Jul. Elevated non-esterified fatty acids impair nitric oxide independent vasodilation, in humans: evidence for a role of inwardly rectifying potassium channels. *Atherosclerosis* 169(1):147-153.
- de la Maza MP, Estevez A, Bunout D, Klenner C, Oyonarte M, Hirsch S. 1994 Apr. Ventricular mass in hypertensive and normotensive obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18(4):193-197.
- de las HN, Aragoncillo P, Maeso R, Vazquez-Perez S, Navarro-Cid J, DeGasparo M, Mann J, Ruilope LM, Cachofeiro V, Lahera V. 1999 Oct. AT(1) receptor antagonism reduces endothelial dysfunction and intimal thickening in atherosclerotic rabbits. *Hypertension* 34(4 Pt 2):969-975.
- de SG, Daniels SR, Devereux RB, Meyer RA, Roman MJ, de DO, Alderman MH. 1992 Nov. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. *J Am Coll Cardiol* 20(5):1251-1260.
- de SG, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH. 1994 May. Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension* 23(5):600-606.

- de WP, Leoni P, Abraham D. 2008 Apra. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors* 26(2):80-91.
- Dellas C, Schafer K, Rohm I, Lankeit M, Ellrott T, Faustin V, Riggert J, Hasenfuss G, Konstantinides S. 2008 Dec. Absence of leptin resistance in platelets from morbidly obese individuals may contribute to the increased thrombosis risk in obesity. *Thromb Haemost* 100(6):1123-1129.
- Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. 1986 Feb. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 57(6):450-458.
- Di B, V, Santini F, Di CA, Pucci A, Talini E, Palagi C, Delle Donne MG, Marsili A, Fierabracci P, Valeriano R, Scartabelli G, Giannetti M, Anselmino M, Pinchera A, Mariani M. 2008. Effects of bariatric surgery on early myocardial alterations in adult severely obese subjects. *Cardiology* 109(4):241-248.
- Di GM, Skinner NS, Jr., Hanley HG, Sachs RG. 1971 Apr. Relationship of adipose tissue blood flow to fat cell size and number. *Am J Physiol* 220(4):932-937.
- Diez J. 2007. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol* 44:76-95.
- Dixon RA, Davidson SM, Wynne AM, Yellon DM, Smith CC. 2009 Apr. The cardioprotective actions of leptin are lost in the Zucker obese (fa/fa) rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 53(4):311-317.
- Donato J, Jr., Frazao R, Elias CF. 2010 Oct. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54(7):591-602.
- Dorn GW, Force T. 2005 Mar. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115(3):527-537.
- Dorresteijn JA, Visseren FL, Spiering W. 2012 Jan. Mechanisms linking obesity to hypertension. *Obes Rev* 13(1):17-26.
- Doyon C, Drouin G, Trudeau VL, Moon TW. 2001 Nov. Molecular evolution of leptin. *Gen Comp Endocrinol* 124(2):188-198.
- Eguchi M, Liu Y, Shin EJ, Sweeney G. 2008 Jun. Leptin protects H9c2 rat cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis. *FEBS J* 275(12):3136-3144.

- Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. 2006 Aug. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:254S-258S.
- Fantuzzi G. 2005 May. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115(5):911-919.
- Farooqi IS, O'Rahilly S. 2005. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med* 56:443-458.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. 2005 Jan. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol* 14(1):1-11.
- Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. 2005 Mar. Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol* 14(2):49-60.
- Fernandes Bertocchi AP, Campanhole G, Wang PH, Goncalves GM, Damiao MJ, Cenedeze MA, Beraldo FC, de Paula AT, V, Dos Reis MA, Mazzali M, Pacheco-Silva A, Camara NO. 2008 Oct. A Role for galectin-3 in renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Transpl Int* 21(10):999-1007.
- Flatt JP, Ravussin E, Acheson KJ, Jequier E. 1985 Sep. Effects of dietary fat on postprandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances. *J Clin Invest* 76(3):1019-1024.
- Flier JS. 1997 Apr. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4242-4245.
- Fortuno A, Bidegain J, Baltanas A, Moreno MU, Montero L, Landecho MF, Beloqui O, Diez J, Zalba G. 2010 Sep. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. *J Hypertens* 28(9):1944-1950.
- Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, Sr., O'Donnell CJ. 2007 Jul. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 116(1):39-48.
- Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. 2003 Aug. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(8):875-888.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. 2001 Jun. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(6):E827-E847.

- Fruhbeck G. 2006 Jana. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393(Pt 1):7-20.
- Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnell JP, Chade AR, Lerman LO, Lerman A. 2007 Feb. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(2):H904-H911.
- Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. 2006 Apr. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(17):6676-6681.
- Graham HK, Horn M, Trafford AW. 2008 Sep. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. European Young Physiologists Symposium Keynote Lecture-Bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)* 194(1):3-21.
- Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, Wason CJ, Oberbach A, Jansson PA, Smith U, Kahn BB. 2006 Jun. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354(24):2552-2563.
- Grassi G, Seravalle G, Scopelliti F, Dell'Oro R, Fattori L, Quarti-Trevano F, Brambilla G, Schiffrin EL, Mancia G. 2010 Jan. Structural and functional alterations of subcutaneous small resistance arteries in severe human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 18(1):92-98.
- Gustafson B. 2010 Apr. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 17(4):332-341.
- Hadi HA, Carr CS, Al SJ. 2005. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 1(3):183-198.
- Hall JE, da Silva AA, do Carmo JM, Dubinion J, Hamza S, Munusamy S, Smith G, Stec DE. 2010 Jun. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *J Biol Chem* 285(23):17271-17276.
- Havel PJ. 2004 Feb. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 53 Suppl 1:S143-S151.
- Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. 1997 Jul. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100(2):270-278.
- Haynes WG. 2005 Sep. Role of leptin in obesity-related hypertension. *Exp Physiol* 90(5):683-688.

- He WH, Li B, Zhu X, Zhang KH, Li BM, Liu ZJ, Liu GY, Wang J. 2010 Nov. [The role and mechanism of NADPH oxidase in leptin-induced reactive oxygen species production in hepatic stellate cells]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 18(11):849-854.
- Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, Schaper J. 2003 Feb. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107(7):984-991.
- Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. 1992 Jul. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75(1):15-20.
- Hill MF, Singal PK. 1997 Oct. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. *Circulation* 96(7):2414-2420.
- Hotamisligil GS. 2007. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and type 2 diabetes. *Novartis Found Symp* 286:86-94.
- Hsueh W, Abel ED, Breslow JL, Maeda N, Davis RC, Fisher EA, Dansky H, McClain DA, McIndoe R, Wassef MK, Rabadan-Diehl C, Goldberg IJ. 2007 May. Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 100(10):1415-1427.
- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. 1983 May. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67(5):968-977.
- Iacobellis G, Leonetti F. 2005 Nov. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90(11):6300-6302.
- Iacobellis G, Ribaldo MC, Leto G, Zappaterreno A, Vecci E, Di MU, Leonetti F. 2002 Aug. Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. *Obes Res* 10(8):767-773.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000 Nov. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49(11):1939-1945.
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. 2003 Jun. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 130(12):2779-2791.

- Jacobson SL, Piper HM. 1986 Jul. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 18(7):661-678.
- Jain A, Avendano G, Dharamsey S, Dasmahapatra A, Agarwal R, Reddi A, Regan T. 1996 Apr. Left ventricular diastolic function in hypertension and role of plasma glucose and insulin. Comparison with diabetic heart. *Circulation* 93(7):1396-1402.
- Janicki JS, Brower GL. 2002 Dec. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail* 8(6 Suppl):S319-S325.
- Jay D, Hitomi H, Griendling KK. 2006 Jan. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 40(2):183-192.
- Jeremy JY, Mikhailidis DP, Dandona P. 1983 Mar. Simulating the diabetic environment modifies in vitro prostacyclin synthesis. *Diabetes* 32(3):217-221.
- Jun dY, Han CR, Choi MS, Bae MA, Woo MH, Kim YH. 2011 May. Effect of mollugin on apoptosis and adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes. *Phytother Res* 25(5):724-731.
- Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjostrom L, Carlsson B, Carlsson LM. 1998 Nov. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 83(11):3925-3929.
- Kenchaiah S, Gaziano JM, Vasan RS. 2004 Sep. Impact of obesity on the risk of heart failure and survival after the onset of heart failure. *Med Clin North Am* 88(5):1273-1294.
- Khong FL, Zhang Y, Edgley AJ, Qi W, Connelly KA, Woodman OL, Krum H, Kelly DJ. 2011. 3',4'-Dihydroxyflavonol antioxidant attenuates diastolic dysfunction and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic m(Ren2)27 rats. *PLoS One* 6(7):e22777.
- Kim BC, Shon BS, Ryoo YW, Kim SP, Lee KS. 2001 Jul. Melatonin reduces X-ray irradiation-induced oxidative damages in cultured human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 26(3):194-200.
- Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. 2007 Jul. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int* 31(7):655-662.
- Knudson JD, Dincer UD, Bratz IN, Sturek M, Dick GM, Tune JD. 2007 Jun. Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation* 14(4-5):317-338.

- Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN, Jr., Koshida R, Picchi A, Focardi M, Dick GM, Tune JD. 2005 Jul. Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(1):H48-H56.
- Koh KK, Park SM, Quon MJ. 2008 Jun. Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *Circulation* 117(25):3238-3249.
- Komardina VS, Tokarev VI. 1977 Mara. [Diagnosis and treatment of tubal pregnancy]. *Pediatr Akus Ginekol*(2):53-55.
- Konstantinides S, Schafer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. 2001 Nov. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. *J Clin Invest* 108(10):1533-1540.
- Konstantinidis D, Paletas K, Koliakos G, Kaloyianni M. 2009. Signaling components involved in leptin-induced amplification of the atherosclerosis-related properties of human monocytes. *J Vasc Res* 46(3):199-208.
- Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T. 2008 Oct. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(4):H1514-H1521.
- Kotchen TA. 2010 Nov. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *Am J Hypertens* 23(11):1170-1178.
- Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. 2002 Nov. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation* 106(22):2848-2853.
- Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. 2012 Jul. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 95(2):194-204.
- Lakka TA, Lakka HM, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT. 2001 Feb. Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men. *Atherosclerosis* 154(2):497-504.
- Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. 2001 May. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 283(4):982-988.

- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise J, Solomon S, Spencer KT, St John SM, Stewart W. 2006 Mar. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 7(2):79-108.
- Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmítko PE, Verma S. 2005 May. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5):H2031-H2041.
- Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P. 2005 Jun. Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 45(6):1050-1055.
- Lear SA, Humphries KH, Kohli S, Frohlich JJ, Birmingham CL, Mancini GB. 2007 Sep. Visceral adipose tissue, a potential risk factor for carotid atherosclerosis: results of the Multicultural Community Health Assessment Trial (M-CHAT). *Stroke* 38(9):2422-2429.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. 1996 Feb. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379(6566):632-635.
- Li RK, Li G, Mickle DA, Weisel RD, Merante F, Luss H, Rao V, Christakis GT, Williams WG. 1997 Aug. Overexpression of transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-I in patients with idiopathic hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 96(3):874-881.
- Li YC, Ding XS, Li HM, Zhang C. 2013 Jun. Icaritin attenuates high glucose-induced type IV collagen and fibronectin accumulation in glomerular mesangial cells by inhibiting TGF-beta production and signalling via G protein-coupled oestrogen receptor 1. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- Lim H, Zhu YZ. 2006 Nov. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci* 63(22):2584-2596.
- Listenberger LL, Schaffer JE. 2002 Apr. Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 12(3):134-138.
- Literature Cited
- Liu C, Cao F, Tang QZ, Yan L, Dong YG, Zhu LH, Wang L, Bian ZY, Li H. 2010 Dec. Allicin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis via attenuating reactive oxygen species-dependent signaling pathways. *J Nutr Biochem* 21(12):1238-1250.
- Lobstein T, Frelut ML. 2003 Nov. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obes Rev* 4(4):195-200.

- Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, Moreno L, Coviello A, Peral De BM, Vera R, Galisteo M, Jimenez R, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. 2006 Aug. Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 544(1-3):97-103.
- Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M. 1997 Sep. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238(2):648-652.
- Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. 1995 Sep. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1(9):950-953.
- Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. 2007 Aug. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res* 101(4):335-347.
- Lowell BB, Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. 1993 Dec. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366(6457):740-742.
- Lu G, Greene EL, Nagai T, Egan BM. 1998 Dec. Reactive oxygen species are critical in the oleic acid-mediated mitogenic signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 32(6):1003-1010.
- Lu G, Morinelli TA, Meier KE, Rosenzweig SA, Egan BM. 1996 Sep. Oleic acid-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. A role for protein kinase C. *Circ Res* 79(3):611-618.
- Luaces M, Cachofeiro V, Garcia-Munoz-Najar A, Medina M, Gonzalez N, Cancer E, Rodriguez-Robles A, Canovas G, Antequera-Perez A. 2012 Jan. Anatomical and functional alterations of the heart in morbid obesity. Changes after bariatric surgery. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 65(1):14-21.
- Madani S, De GS, Munoz DM, Li RK, Sweeney G. 2006 Feb. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 69(3):716-725.
- Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, Speizer FE, Hennekens CH. 1990 Mar. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 322(13):882-889.

- Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, Hennekens CH, Speizer FE. 1995 Sep. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med* 333(11):677-685.
- Marin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjöström L, Björntorp P. 1992 Nov. The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism* 41(11):1242-1248.
- Martin SS, Qasim A, Reilly MP. 2008 Oct. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 52(15):1201-1210.
- Maya-Monteiro CM, Bozza PT. 2008 Jun. Leptin and mTOR: partners in metabolism and inflammation. *Cell Cycle* 7(12):1713-1717.
- McGaffin KR, Sun CK, Rager JJ, Romano LC, Zou B, Mathier MA, O'Doherty RM, McTiernan CF, O'Donnell CP. 2008 Jan. Leptin signalling reduces the severity of cardiac dysfunction and remodelling after chronic ischaemic injury. *Cardiovasc Res* 77(1):54-63.
- McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. 2002 Jun. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation* 105(23):2712-2718.
- Meier U, Gressner AM. 2004 Sep. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 50(9):1511-1525.
- Meyer CW, Korthaus D, Jagla W, Cornali E, Grosse J, Fuchs H, Klingenspor M, Roemheld S, Tschöp M, Heldmaier G, De Angelis MH, Nehls M. 2004 May. A novel missense mutation in the mouse growth hormone gene causes semidominant dwarfism, hyperghrelinemia, and obesity. *Endocrinology* 145(5):2531-2541.
- Miana M, de Las HN, Rodriguez C, Sanz-Rosa D, Martin-Fernandez B, Mezzano S, Lahera V, Martinez-Gonzalez J, Cachafeiro V. 2011 Feb. Effect of eplerenone on hypertension-associated renal damage in rats: potential role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma). *J Physiol Pharmacol* 62(1):87-94.
- Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. 2002 Jan. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415(6869):339-343.

- Mitcheson JS, Hancox JC, Levi AJ. 1998 Aug. Cultured adult cardiac myocytes: future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovasc Res* 39(2):280-300.
- Montague CT, O'Rahilly S. 2000 Jun. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 49(6):883-888.
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S. 1997 Mar. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 46(3):342-347.
- Morse SA, Zhang R, Thakur V, Reisin E. 2005 Dec. Hypertension and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 330(6):303-310.
- Munzberg H, Myers MG, Jr. 2005 May. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8(5):566-570.
- Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. 1999 Feb. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 48(2):426-429.
- Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. 1999 Feb. Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 48(2):426-429.
- Naldini A, Carraro F, Fleischmann WR, Jr., Bocci V. 1993 Apr. Hypoxia enhances the antiviral activity of interferons. *J Interferon Res* 13(2):127-132.
- Nicklas BJ, Cesari M, Penninx BW, Kritchevsky SB, Ding J, Newman A, Kitzman DW, Kanaya AM, Pahor M, Harris TB. 2006 Mar. Abdominal obesity is an independent risk factor for chronic heart failure in older people. *J Am Geriatr Soc* 54(3):413-420.
- Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. 2004. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J* 19(7-9):527-535.
- Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, Tserng KY, Hoit BD, Ernsberger P, Young ME, Stanley WC. 2006 Jul. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1):H38-H44.
- Orzano AJ, Scott JG. 2004 Sep. Diagnosis and treatment of obesity in adults: an applied evidence-based review. *J Am Board Fam Pract* 17(5):359-369.

- Osborne-Pellegrin M, Labat C, Mercier N, Challande P, Lacolley P. 2010 Jul. Changes in aortic stiffness related to elastic fiber network anomalies in the Brown Norway rat during maturation and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(1):H144-H152.
- Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de GP, Heine RJ, Maassen JA, Diamant M. 2005 Jun. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* 48(6):1229-1237.
- Palanivel R, Eguchi M, Shuralyova I, Coe I, Sweeney G. 2006 Aug. Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism* 55(8):1067-1075.
- Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, Greaves DR. 2008 Mar. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3):433-440.
- Park SY, Cho YR, Kim HJ, Higashimori T, Danton C, Lee MK, Dey A, Rothermel B, Kim YB, Kalinowski A, Russell KS, Kim JK. 2005 Dec. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes* 54(12):3530-3540.
- Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kuhl U, Schultheiss HP. 1999 Jun. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 99(21):2750-2756.
- Pepys MB, Hirschfield GM. 2003 Jun. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 111(12):1805-1812.
- Perbal B. 2004 Jan. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363(9402):62-64.
- Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, Dence C, Klein S, Marsala J, Meyer T, Gropler RJ. 2004 May. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation* 109(18):2191-2196.
- Pi-Sunyer FX. 1993 Oct. Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med* 119(7 Pt 2):655-660.

- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. 2006 May. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(5):968-976.
- Porter KE, Turner NA. 2009 Aug. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123(2):255-278.
- Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, Cassese A, Beguinot F, Arturi F, Hribal ML, Perticone F, Sesti G. 2009 Aug. Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein. *Endocrinology* 150(8):3584-3593.
- Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG. 2005 Jul. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 54(7):2012-2018.
- Rahmouni K. 2010 Maya. Leptin-Induced Sympathetic Nerve Activation: Signaling Mechanisms and Cardiovascular Consequences in Obesity. *Curr Hypertens Rev* 6(2):104-209.
- Rajapurohitam V, Gan XT, Kirshenbaum LA, Karmazyn M. 2003 Auga. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 93(4):277-279.
- Rasouli N, Kern PA. 2008 Nov. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93(11 Suppl 1):S64-S73.
- Ravussin E, Galgani JE. 2011 Aug. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr* 31:33-47.
- Redon J, Cifkova R, Laurent S, Nilsson P, Narkiewicz K, Erdine S, Mancia G. 2009 Mar. Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome. *J Hypertens* 27(3):441-451.
- Reisin E, Jack AV. 2009 May. Obesity and hypertension: mechanisms, cardio-renal consequences, and therapeutic approaches. *Med Clin North Am* 93(3):733-751.
- Reiter RJ, Tan DX. 2002 May. Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann N Y Acad Sci* 957:341-344.
- Ren J, Zhu BH, Relling DP, Esberg LB, Ceylan-Isik AF. 2008 Nov. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity (Silver Spring)* 16(11):2417-2423.

- Rocchini AP. 1992 Jan. Cardiovascular regulation in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 19(1 Suppl):I56-I60.
- Rock FL, Altmann SW, van HM, Kastelein RA, Bazan JF. 1996 Dec. The leptin haemopoietic cytokine fold is stabilized by an intrachain disulfide bond. *Horm Metab Res* 28(12):649-652.
- Rodriguez A, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Garcia-Navarro S, Rotellar F, Valenti V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Burrell MA, Calamita G, Malagon MM, Fruhbeck G. 2011 Apr. Insulin- and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 96(4):E586-E597.
- Rosengren A, Wedel H, Wilhelmsen L. 1999 Feb. Body weight and weight gain during adult life in men in relation to coronary heart disease and mortality. A prospective population study. *Eur Heart J* 20(4):269-277.
- Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. 2007 May. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res* 74(2):196-206.
- Rytka JM, Wueest S, Schoenle EJ, Konrad D. 2011 Jan. The portal theory supported by venous drainage-selective fat transplantation. *Diabetes* 60(1):56-63.
- Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Tsuji T, Hayase M, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Yoshimasa Y, Nakao K. 1999 Sep. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes* 48(9):1787-1793.
- Schafer K, Halle M, Goeschen C, Dellas C, Pynn M, Loskutoff DJ, Konstantinides S. 2004 Jan. Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1):112-117.
- Schenk S, Horowitz JF. 2007 Jun. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117(6):1690-1698.
- Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Ribeiro MF, Clausell N, Bello-Klein A. 2010 Aug. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 341(1-2):1-8.
- Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Ludke AR, Ribeiro MF, Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Bello-Klein A. 2012 Jun. Time course of hydrogen peroxide-

- thioredoxin balance and its influence on the intracellular signalling in myocardial infarction. *Exp Physiol* 97(6):741-749.
- Schonfeld P, Wojtczak L. 2008 Aug. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 45(3):231-241.
- Schram K, Sweeney G. 2008 Aug. Implications of myocardial matrix remodeling by adipokines in obesity-related heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 18(6):199-205.
- Schram K, Wong MM, Palanivel R, No EK, Dixon IM, Sweeney G. 2008 May. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 44(5):874-881.
- Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL. 2002 Sep. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(3):H976-H982.
- Shan J, Nguyen TB, Totary-Jain H, Dansky H, Marx SO, Marks AR. 2008 Dec. Leptin-enhanced neointimal hyperplasia is reduced by mTOR and PI3K inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48):19006-19011.
- Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. 2004 Nov. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 110(19):3121-3128.
- Sharma V, Mustafa S, Patel N, Wambolt R, Allard MF, McNeill JH. 2009 Sep. Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* 617(1-3):113-117.
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. 2006 Nov. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116(11):3015-3025.
- Shin EJ, Schram K, Zheng XL, Sweeney G. 2009 Nov. Leptin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of the intrinsic pathway of apoptosis in rat H9c2 cells. *J Cell Physiol* 221(2):490-497.
- Shyu KG, Wang BW, Chen WJ, Kuan P, Lin CM. 2012 Jan. Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast. *Eur J Clin Invest* 42(1):17-26.

- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. 1998 Sep. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281(5383):1683-1686.
- Sims EA. 1976 Jul. Experimental obesity, dietary-induced thermogenesis, and their clinical implications. *Clin Endocrinol Metab* 5(2):377-395.
- Singhal A, Farooqi IS, Cole TJ, O'Rahilly S, Fewtrell M, Kattenhorn M, Lucas A, Deanfield J. 2002 Oct. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease?. *Circulation* 106(15):1919-1924.
- Skilton MR, Celermajor DS. 2006 Jul. Endothelial dysfunction and arterial abnormalities in childhood obesity. *Int J Obes (Lond)* 30(7):1041-1049.
- Smith CC, Mocanu MM, Davidson SM, Wynne AM, Simpkin JC, Yellon DM. 2006 Sep. Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol* 149(1):5-13.
- Sorof JM, Poffenbarger T, Franco K, Bernard L, Portman RJ. 2002 Jun. Isolated systolic hypertension, obesity, and hyperkinetic hemodynamic states in children. *J Pediatr* 140(6):660-666.
- Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, . 1995 Oct. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377(6549):530-532.
- Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. 2004 Jun. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr Relat Disord* 2(2):82-104.
- Sweeney G. 2002 Aug. Leptin signalling. *Cell Signal* 14(8):655-663.
- Sweeney G. 2010 Jan. Cardiovascular effects of leptin. *Nat Rev Cardiol* 7(1):22-29.
- Syed M, Rosati C, Torosoff MT, El-Hajjar M, Feustel P, Alger S, Singh P, Fein S. 2009 Jan. The impact of weight loss on cardiac structure and function in obese patients. *Obes Surg* 19(1):36-40.
- Szkudelski T. 2007. Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes. *Physiol Res* 56(5):503-512.
- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T,

- Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. 2009 Sep. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab* 10(3):178-188.
- Talayero BG, Sacks FM. 2011 Dec. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 13(6):544-552.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. 1995 Deca. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83(7):1263-1271.
- Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, Zymek P, Gaubatz JW, Reddy AK, Taffet G, Michael LH, Entman ML, Ballantyne CM. 2006 Nov. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(5):H2504-H2514.
- Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. 2008 Feb. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol* 172(2):545-553.
- Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. 2008 May. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7(5):410-420.
- Trayhurn P, Wang B, Wood IS. 2008 Aug. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?. *Br J Nutr* 100(2):227-235.
- Trayhurn P, Wood IS. 2004 Sep. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92(3):347-355.
- Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. 2003 Dec. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 52(12):2882-2887.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. 2011 Dec. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(6):H2181-H2190.
- Tumer N, Erdos B, Matheny M, Cudykier I, Scarpace PJ. 2007 Dec. Leptin antagonist reverses hypertension caused by leptin overexpression, but fails to normalize obesity-related hypertension. *J Hypertens* 25(12):2471-2478.

- Turkbey EB, McClelland RL, Kronmal RA, Burke GL, Bild DE, Tracy RP, Arai AE, Lima JA, Bluemke DA. 2010 Mar. The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *JACC Cardiovasc Imaging* 3(3):266-274.
- Urtasun R, Lopategi A, George J, Leung TM, Lu Y, Wang X, Ge X, Fiel MI, Nieto N. 2012 Feb. Osteopontin, an oxidant stress sensitive cytokine, up-regulates collagen-I via integrin alpha(V)beta(3) engagement and PI3K/pAkt/NFkappaB signaling. *Hepatology* 55(2):594-608.
- Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM. 1996 Sep. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14(1):95-97.
- Van HM, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR, Jr. 1997 Feb. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 99(3):385-390.
- Verreth W, De KD, Pelat M, Verhamme P, Ganame J, Bielicki JK, Mertens A, Quarck R, Benhabiles N, Marguerie G, Mackness B, Mackness M, Ninio E, Herregods MC, Balligand JL, Holvoet P. 2004 Nov. Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation* 110(20):3259-3269.
- Vilahur G, Juan-Babot O, Pena E, Onate B, Casani L, Badimon L. 2011 Mar. Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 50(3):522-533.
- Villa E, Rabano A, Albarran OG, Ruilope LM, Garcia-Robles R. 1998 Jul. Effects of chronic combined treatment with captopril and pravastatin on the progression of insulin resistance and cardiovascular alterations in an experimental model of obesity in dogs. *Am J Hypertens* 11(7):844-851.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, Nuutila P. 2009 Apr. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360(15):1518-1525.
- Wada J. 2008 Mar. Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. *Expert Opin Investig Drugs* 17(3):327-333.

- Wajchenberg BL. 2000 Dec. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21(6):697-738.
- Wan SY, Zhang TF, Ding Y. 2011 Dec. Galectin-3 enhances proliferation and angiogenesis of endothelial cells differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 43(10):3933-3938.
- Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. 1998 Jun. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393(6686):684-688.
- Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB, Sr., Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ. 2004 Nov. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 292(20):2471-2477.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Durrington PN, Perry IJ. 1998 Nov. Hypertension, serum insulin, obesity and the metabolic syndrome. *J Hum Hypertens* 12(11):735-741.
- Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL. 2007 Jan. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest* 37(1):8-17.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2006 Jan. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116(1):115-124.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005 May. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115(5):1111-1119.
- Wenzel UO, Benndorf R, Lange S. 2013 Jan. Treatment of arterial hypertension in obese patients. *Semin Nephrol* 33(1):66-74.
- Whittaker P. 1995 Jun. Unravelling the mysteries of collagen and cicatrix after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 29(6):758-762.
- Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Hukins C, Jenkins C, Marwick TH. 2006 Feb. Association of subclinical right ventricular dysfunction with obesity. *J Am Coll Cardiol* 47(3):611-616.
- Xu X, Hu X, Lu Z, Zhang P, Zhao L, Wessale JL, Bache RJ, Chen Y. 2008 Nov. Xanthine oxidase inhibition with febuxostat attenuates systolic overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *J Card Fail* 14(9):746-753.
- Yakinci C, Mungen B, Karabiber H, Tayfun M, Evereklioglu C. 2000 May. Autonomic nervous system functions in obese children. *Brain Dev* 22(3):151-153.

- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. 2001 Jul. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276(27):25096-25100.
- Yu M, Zheng Y, Sun HX, Yu DJ. 2012. Inhibitory effects of enalaprilat on rat cardiac fibroblast proliferation via ROS/P38MAPK/TGF-beta1 signaling pathway. *Molecules* 17(3):2738-2751.
- Yu SY, Liu L, Li P, Li J. 2013 Apr. Rapamycin inhibits the mTOR/p70S6K pathway and attenuates cardiac fibrosis in adriamycin-induced dilated cardiomyopathy. *Thorac Cardiovasc Surg* 61(3):223-228.
- Yu Y, Ohmori K, Chen Y, Sato C, Kiyomoto H, Shinomiya K, Takeuchi H, Mizushige K, Kohno M. 2004 Aug. Effects of pravastatin on progression of glucose intolerance and cardiovascular remodeling in a type II diabetes model. *J Am Coll Cardiol* 44(4):904-913.
- Zeidan A, Hunter JC, Javadov S, Karmazyn M. 2011 Jun. mTOR mediates RhoA-dependent leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 352(1-2):99-108.
- Zeidan A, Javadov S, Karmazyn M. 2006 Oct. Essential role of Rho/ROCK-dependent processes and actin dynamics in mediating leptin-induced hypertrophy in rat neonatal ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 72(1):101-111.
- Zeymer U, Parhofer KG, Pittrow D, Binz C, Schwertfeger M, Limbourg T, Rother J. 2009 Apr. Risk factor profile, management and prognosis of patients with peripheral arterial disease with or without coronary artery disease: results of the prospective German REACH registry cohort. *Clin Res Cardiol* 98(4):249-256.
- Zhang Y, Huang C. 2012 Jan. Targeting adipocyte apoptosis: a novel strategy for obesity therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 417(1):1-4.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994 Deca. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505):425-432.
- Zhou Y, Jia X, Wang G, Wang X, Liu J. 2009 May. PI-3 K/AKT and ERK signaling pathways mediate leptin-induced inhibition of PPARgamma gene expression in primary rat hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem* 325(1-2):131-139.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. 2000 Feb. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4):1784-1789.

Zibadi S, Cordova F, Slack EH, Watson RR, Larson DF. 2011 Dec. Leptin's regulation of obesity-induced cardiac extracellular matrix remodeling. *Cardiovasc Toxicol* 11(4):325-333.

Zima AV, Blatter LA. 2006 Jul. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 71(2):310-321.

