



Cinvestav-Monterrey

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**EFFECTO DE LA OBESIDAD EN LA SÍNTESIS DE TROMBOXANO A₂ EN
LA CIRCULACIÓN CORONARIA**

Tesis que presenta

Selma Romina López Vaquera

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis:

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Apodaca, Nuevo León

Agosto 2016

Dedicatorias

A mi familia, por ser mi pilar y recordarme lo que es verdaderamente importante en la vida. A mis padres, Yolanda y Francisco Javier por su inmenso amor y el apoyo incondicional que me brindan. Nunca podré agradecerles lo suficiente. A mis hermanos, Arantxa y Nahúm, por su gran cariño incondicional, comprensión y paciencia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por que se me otorgó y por el apoyo económico proporcionado para la realización del proyecto.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Monterrey por permitirme mi formación académica en esta institución y por las facilidades brindadas para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta por darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría. Por su invaluable apoyo, por contribuir en mi formación académica y científica y por fomentar el pensamiento crítico en mí.

A la Q.F.B. Amelia Ríos Rodríguez por las muy valiosas enseñanzas y por los consejos que me brindó.

A la Dra. Ana María Gámez Méndez y al M.C. Alberto Peña por la importante contribución y apoyo en la realización técnica de éste proyecto.

Al Dr. Daniel P. Sánchez Herrera y al Dr. Moisés Santillán Zerón por la enriquecedora orientación.

A mis amigos y compañeros del CINVESTAV, en especial a Rocío Mercado, Jorge Arias y Carlos Díaz. Por los momentos tan amenos que compartimos, por darme su confianza y por todo lo que me han enseñado.

A Diana Laura Vargas Castillo y Aideé Silva Magdaleno.

Índice

Índice	IV
Índice de figuras	VII
Abreviaturas	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	1
Obesidad	1
<i>Definición</i>	1
<i>Etiología</i>	2
<i>Epidemiología</i>	3
<i>Enfermedades asociadas a la obesidad</i>	4
Enfermedades cardiovasculares	4
<i>La pared vascular</i>	5
<i>Endotelio vascular</i>	6
<i>Disfunción Endotelial</i>	7
<i>Efectos del estrés oxidativo en el metabolismo celular</i>	8
<i>Metabolismo del ácido araquidónico (AA) en células endoteliales</i>	9
Antecedentes	11

Justificación.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS	14
Objetivo General	14
Objetivos Particulares	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
Protocolo Experimental	15
Animales de experimentación	16
Grupos experimentales	16
<i>Grupo Control.....</i>	<i>16</i>
<i>Grupo Obeso.....</i>	<i>16</i>
<i>Grupo Obeso tratado con FeTMPyP</i>	<i>17</i>
Perfil metabólico y cuantificación de peso corporal.....	17
Medición de la expresión relativa de la enzima TXS	17
<i>Disección de tejido cardíaco.....</i>	<i>17</i>
<i>Homogenización y lisis de tejido cardíaco.....</i>	<i>18</i>
<i>Cuantificación de proteína total por el método del ácido biciconínico (BCA)</i>	<i>18</i>
<i>Separación de proteínas por peso molecular por SDS-PAGE.....</i>	<i>19</i>
<i>Electrotransferencia de las proteínas</i>	<i>19</i>
<i>Western Blot.....</i>	<i>19</i>

Evaluación de la respuesta vascular a ACh en arterias coronarias	20
<i>Extracción de corazón</i>	20
<i>Técnica Langendorff para corazón aislado</i>	21
Cuantificación de TXB ₂ a partir de perfusados de arterias coronarias	22
<i>Obtención de perfusados de arterias coronarias</i>	22
<i>ELISA</i>	22
Análisis estadísticos	23
RESULTADOS	24
Efectos de la dieta alta en grasas en la respuesta vascular de las arterias coronarias	24
Efecto de la ACh en la liberación de TXA ₂ en circulación coronaria.....	27
Efecto de la obesidad en la expresión de TXS.....	29
DISCUSIÓN	31
Conclusiones	34
Perspectivas	35
Referencias	36

Índice de figuras

- Figura 1) Generación de ONOO⁻ a partir de NO y O₂⁻;** NOS: sintasa de óxido nítrico, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, O₂⁻: superóxido, NO: óxido nítrico, ONOO⁻: peroxinitrito.....9
- Figura 2) Metabolismo del AA por la vía de las COX;** cPLA₂: fosfolipasa A₂ citosólica, AA: ácido araquidónico, COX-1/2: ciclooxigenasas isoformas 1 y 2, PGG₂: 9,11-endoperóxido cíclico 15-hidroperóxido G₂, PGH₂: prostaglandina H₂, PGIS: prostaciclina sintasa, PGE₂: prostaglandina E₂, PGI₂: prostaciclina..... 10
- Figura 3) Protocolo experimental.** 15
- Figura 4) Registro representativo de la respuesta vascular (mmHg) del grupo Control en función del tiempo (segundos) tras un estímulo de ACh (12µg). La flecha indica el momento de la adición de ACh. La línea punteada señala el nivel de máxima contracción tras el estímulo.....25
- Figura 5) Registro representativo de la respuesta vascular coronaria (mmHg) del grupo Obeso tras un estímulo de ACh (12µg) en función del tiempo (segundos). La flecha indica el momento de la adición de ACh. La línea punteada señala el nivel de máxima contracción tras el estímulo.25
- Figura 6) Registro representativo de la respuesta vascular coronaria (mmHg) del grupo Obeso tratado con FeTMPyP tras un estímulo de ACh (12µg) en función del tiempo (segundos). La flecha indica el momento de la adición de ACh. La línea punteada señala el nivel de máxima contracción tras el estímulo.26
- Figura 7) Liberación de TXA₂ en arterias coronarias.** Cuantificación de la concentración de TXB₂ por medio de ELISA, a partir de perfusados de arterias coronarias de los grupos Control, Obeso y Obeso + FeTMPyP. Se muestran las concentraciones correspondientes a la condición basal y a las fases de máxima contracción tras el estímulo de ACh. Las barras representan la media de las concentraciones expresadas en pg/mL (± error estándar de la media), n=4-6 por

grupo. Las comparaciones se realizaron entre cada condición de los grupos experimentales (*P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01).....28

Figura 8) Niveles de expresión relativa de TXS en corazón. A) Bandas representativas de la detección de TXS (61 KDa) por Western blot. Se empleó a GAPDH (35 KDa) como control de carga. B) Análisis de densitometría de las imágenes. Las barras representan la media (± error estándar de la media) del cociente de densidad de banda entre TXS y GAPDH, expresado en unidades arbitrarias correspondientes a los grupos Control, Obeso y Obeso + FeTMPyP; n=4 ratones por grupo. Las comparaciones se realizaron entre cada uno de los grupos experimentales (*P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01).....30

Abreviaturas

°C:	Grados centígrados
µg:	Microgramos
µl:	Microlitros
AA:	Ácido araquidónico
ACh:	Acetilcolina
COX:	Ciclooxigenasas
COX-1:	Ciclooxigenasa isoforma 1
COX-2:	Ciclooxigenasa isoforma 2
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FeTMPyP:	5,10,15,20-tetrakis (N-metil-4'-piridil) porfirinato de hierro
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IMC:	Índice de Masa Corporal
kDa:	Kilodaltons
mg:	Miligramos
ml:	Mililitros
mM:	Milimolar
mmHg:	Milímetros de mercurio
NaCl:	Cloruro de sodio
NO:	Óxido nítrico
O₂⁻:	Superóxido
ONOO⁻:	Peroxinitrito
PPC:	Presión de perfusión coronaria
ROS:	Especies reactivas de Oxígeno
RNS:	Especies reactivas de Nitrógeno
rpm:	Revoluciones por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis desnaturizante con SDS en gel de poliacrilamida
SPyO:	Sobrepeso y obesidad
TBS:	Buffer Tris salino
TBS-T:	Buffer Tris salino y Tween-20
Tris:	Tris (hidroximetil)-aminometano
TXA₂:	Tromboxano A ₂
TXB₂:	Tromboxano B ₂
TXS:	Tromboxano A ₂ Sintasa

RESUMEN

EFFECTO DE LA OBESIDAD EN LA SÍNTESIS DE TROMBOXANO A₂ EN LA CIRCULACIÓN CORONARIA

Se ha observado que la obesidad desencadena estrés oxidativo crónico dando como resultado la alteración de la homeostasis vascular lo cual promueve el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En particular, el metabolismo de las células endoteliales vasculares se ve directamente afectado por el estrés oxidativo provocado por especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS/RNS). El objetivo de este estudio fue investigar el papel del estrés oxidativo en la respuesta vascular de las arterias coronarias mediado por el vasoconstrictor tromboxano A₂ (TXA₂) durante la obesidad. Se emplearon ratones (C57BL/6) los cuales fueron alimentados durante 8 semanas con una dieta alta en grasas (grupo obeso) o con una dieta estándar (grupo control). Con el fin de evaluar el efecto de la RNS peroxinitrito (ONOO⁻) durante la obesidad, los animales fueron tratados con FeTMPyP (25 mg/kg/día; vía intraperitoneal) durante 20 días para catalizar la degradación de ONOO⁻. Se utilizó el sistema Langendorff de corazón aislado para evaluar la respuesta vascular a acetilcolina (ACh) y para obtener perfusados de las arterias coronarias. Se cuantificó el metabolito tromboxano B₂ (TXB₂) a partir de perfusados mediante la técnica ELISA. Se midió la expresión de la enzima tromboxano sintasa (TXS) por medio de Western blot. Se observó un aumento de la respuesta contráctil a ACh en el grupo obeso comparado con el grupo control, esto se asoció con una expresión elevada de TXS y un aumento en la síntesis de TXA₂. El tratamiento con FeTMPyP previno el aumento en la respuesta contráctil a ACh, en la expresión de TXS y en la síntesis de TXB₂ que fueron observados en los ratones obesos. Por tanto, sugerimos que ONOO⁻ promueve la vasoconstricción coronaria mediante la vía de las ciclooxygenasas a través de metabolitos vasoconstrictores en ratones obesos.

ABSTRACT

EFFECT OF OBESITY IN THROMBOXANE A₂ SYNTHESIS IN CORONARY CIRCULATION

Obesity leads to chronic oxidative stress altering vascular homeostasis and promoting development of cardiovascular diseases. Endothelium metabolism is directly affected by oxidative stress caused by reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS/RNS). We investigated the role of oxidative stress on coronary vascular response mediated by thromboxane A₂ (TXA₂) during obesity. Mice (C57BL/6) were fed with standard chow or a high fat diet for 8 weeks. To evaluate the role of the RNS peroxynitrite (ONOO⁻) during obesity, mice were treated with a ONOO⁻ decomposition catalyst FETMPyP (25 mg/kg/day) for 20 days. Langendorff isolated perfused heart system was used to evaluate vascular response to acetylcholine (ACh) in coronary arteries and to obtain perfusates. thromboxane B₂ (TXB₂) was quantified in perfusates by ELISA. Thromboxane synthase (TXS) expression was measured by western blot. An enhanced contractile response to ACh was observed in obese group compared with control group; this was associated with an elevated expression of TXS and increased TXA₂ synthesis. FETMPyP treatment prevented the enhanced contractile response to ACh, and the altered expression of TXS and synthesis of TXB₂ observed in obese mice. We suggest that peroxynitrite promotes coronary vasoconstriction through cyclooxygenase pathway vasoconstrictor metabolites in obese mice.

INTRODUCCIÓN

La creciente epidemia de obesidad es uno de los principales problemas de salud pública en el siglo XXI. La obesidad se considera una enfermedad de curso crónico y de etiología multifactorial, puesto que para su desarrollo es necesaria la interacción de múltiples factores como predisposición genética, sedentarismo y dietas altas en grasas y azúcares. La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles altamente incapacitantes y de gran prevalencia. Por ejemplo, diabetes mellitus tipo 2, insuficiencia renal, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Estas enfermedades tienen como factor común la disfunción endotelial; una de las primeras manifestaciones de enfermedad vascular. La disfunción endotelial es una alteración compleja propiciada por la obesidad que está presente en numerosas enfermedades y es particularmente determinante en la progresión de enfermedades cardiovasculares como son aterosclerosis¹, hipertensión², isquemia e infarto³.

Obesidad

Definición

La obesidad es considerada como la enfermedad nutricional más común del mundo y dada su magnitud ha sido reconocida desde 1997 como un problema de salud pública a nivel mundial⁴. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como una acumulación excesiva o anormal de grasa corporal, hasta tal punto que represente un riesgo para la salud del individuo⁵. La hipertrofia en los adipocitos es la anatomía patológica de la obesidad y se ve acompañada de alteraciones en el metabolismo que predisponen en gran medida al desarrollo de diversas patologías⁶. Se ha designado al índice de masa corporal (IMC) como un indicador para el diagnóstico de la obesidad, dado que un aumento de grasa corporal se correlaciona con un aumento en la masa corporal. Este se calcula dividiendo la masa corporal entre el cuadrado de la estatura de un individuo ($IMC = \text{kg}/\text{m}^2$), un índice en un rango entre 25 a 30 kg/m^2 indica sobrepeso, mientras si es igual o

mayor a 30 kg/m² se considera obesidad. El IMC es el indicador de estado nutricional de mayor uso debido a que resulta conveniente para propósitos clínicos y estudios epidemiológicos⁷. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que los riesgos de salud atribuibles a la obesidad se asocian principalmente a los depósitos de grasa visceral. Ésta se localiza en la parte interna de las cavidades corporales, principalmente cubriendo órganos localizados en el área abdominal y se caracteriza por ser metabólicamente activa^{8,9}. Se ha observado que este tipo de distribución del tejido adiposo está mayormente relacionada con disfunción metabólica y representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares¹⁰. Por ello, se ha propuesto el uso de indicadores que permitan distinguir la distribución del tejido adiposo en el cuerpo y determinar obesidad abdominal, tales como la circunferencia de la cintura, proporción cintura-cadera (circunferencia de la cintura/circunferencia de la cadera) o técnicas de diagnóstico por imagen como tomografía computarizada o resonancia magnética^{11,12,13}.

Etiología

La obesidad es consecuencia directa de un desequilibrio entre el consumo y aporte de energía: un consumo energético excesivo (dieta) y un gasto energético bajo (actividad física y metabolismo basal)¹⁴. El aumento dramático de la obesidad en las últimas décadas sugiere que existen más determinantes que contribuyen al desequilibrio energético que da lugar a la obesidad; por ejemplo, factores genéticos, fisiológicos y ambientales¹⁵. La dieta juega un papel muy importante en el desarrollo de la obesidad, en particular aquellas dietas con altos contenido de azúcares refinados y/o grasas saturadas, debido a que propician el aumento de grasa corporal¹⁶. La grasa es el macronutriente con mayor contenido energético (38 kJ/g), por lo que un aumento en el consumo de éste en la dieta diaria podría fácilmente promover el aumento de grasa corporal y la obesidad¹⁷. Estudios epidemiológicos han demostrado una relación significativa entre el consumo de grasas e indicadores de obesidad^{18,19}. Otros factores de riesgo importantes que han sido documentados son la inactividad física y el sedentarismo²⁰.

Por otro lado, los factores genéticos involucrados en la obesidad regulan la distribución del tejido graso, la tasa metabólica, la respuesta al ejercicio y dieta, así

como el control de la alimentación²¹. La evidencia de la influencia de la herencia genética se ha observado en mutaciones puntuales de un solo gen, por ejemplo en los genes que codifican para leptina, receptor de leptina, pro-opiomelanocortina, PPAR- γ (receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma) y proteína convertasa 1, en síndromes mendelianos con obesidad como característica clínica (Prader-Willi, Wilson-Turner, Bodet-Bield), y en modelos animales de obesidad (animales transgénicos, genéticamente obesos)²². A la fecha se han identificado más de 300 genes y/o marcadores genéticos en 24 cromosomas relacionados con fenotipos de obesidad²³. Por lo anterior se sugiere que la contribución genética sobre la obesidad es el resultado de una herencia poligénica²⁴.

Epidemiología

En las últimas tres décadas el número de personas con sobrepeso y obesidad (SPyO) tuvo un incremento alarmante a nivel mundial. Actualmente, más de 1,900 millones de adultos presentan sobrepeso, de los cuales 600 millones son obesos. Este problema no excluye a la población infantil puesto que 41 millones de niños menores de 5 años tienen SPyO²⁵. En cuanto a prevalencia a nivel mundial, México ocupa el 2° lugar en obesidad adulta y el 4° lugar en obesidad infantil²⁶. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición mostró cifras alarmantes: siete de cada diez adultos mexicanos sufren SPyO, presentando un aumento de un 15.2% de 2000 a 2012 en la población y una prevalencia mayor al 30% a partir de los 5 años de edad²⁷. La alta prevalencia de esta enfermedad ha llevado a una crisis de salud pública en México, con un costo entre los 82 y 98 mil millones de pesos que equivalen a 73% y 87% del gasto programable en salud de 2012, considerando solamente los costos atribuibles por diabetes, una de las múltiples enfermedades asociadas a la obesidad²⁸. En un estudio realizado en 2013 se estimaron los costos atribuibles a enfermedades asociadas a la obesidad, tales como diabetes tipo 2, infarto al miocardio, embolia, osteoartritis de rodilla, así como cánceres de mama, riñón, colon, esófago, endometrio y vejiga. Se calculó un gasto de 806 millones de dólares para 2010. Asimismo, se proyectó un aumento a 12 mil millones y 17 mil millones de dólares para 2030 y 2050, respectivamente²⁹.

Enfermedades asociadas a la obesidad

Una gran cantidad de evidencia clínica y experimental demuestra que la obesidad induce una serie de alteraciones metabólicas que median el desarrollo de una gran variedad de enfermedades. Algunos de los primeros trastornos metabólicos detectables son hiperglicemia, resistencia a la insulina, dislipidemia y altos niveles de colesterol; los cuales forman parte de lo que se ha denominado como síndrome metabólico³⁰. También se ha observado que prevalece un estado pro-trombótico y pro-inflamatorio³¹. Las enfermedades que se han visto mayormente ligadas a la obesidad son crónicas, no transmisibles, de gran prevalencia, y algunas de ellas llegan a ser altamente incapacitantes. Por ejemplo: diabetes tipo 2, enfermedades osteoarticulares, cáncer de colon, mama y próstata, insuficiencia renal y enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, hipertensión, cardiopatía isquémica e infartos³².

Enfermedades cardiovasculares

En 1983, el estudio de Framingham mostró a la obesidad como un factor de riesgo significativo e independiente de desarrollo de enfermedad cardiovascular; mostrándose como un factor de predicción de riesgo a largo plazo³³. El aumento de riesgo cardiovascular en obesos se debe, en parte, a alteraciones hemodinámicas y metabólicas. La obesidad por sí misma es una causa directa de anormalidades estructurales, como hipertrofia ventricular izquierda (que puede predisponer a cardiomiopatías), insuficiencia cardíaca congestiva y fibrilación auricular²¹. La obesidad produce un incremento en el volumen de sangre total y en el gasto cardíaco, lo cual es causado en parte por el aumento de la demanda metabólica inducida por el exceso de peso corporal. El aumento del gasto cardíaco es atribuible principalmente al aumento del volumen de eyección, puesto que la frecuencia cardíaca aumenta poco. El aumento consecuente del llenado y presión en el ventrículo izquierdo lleva a una dilatación y a hipertrofia del mismo³⁴.

A comparación de los pacientes de peso normal, los obesos son más propensos a ser hipertensos. A su vez, el aumento de la masa corporal se asocia con un aumento de la presión arterial³⁵. La hipertensión arterial es el aumento sostenido

de los valores de presión arterial sistólica y/o diastólica. En sí misma la hipertensión representa un factor de riesgo de episodios cardiovasculares. La obesidad propicia el aumento de la presión arterial sistémica a consecuencia de que el corazón es sometido a mayor trabajo. Esto se debe a que al haber tejido adiposo en exceso, son necesarios una mayor vascularización y un mayor volumen sanguíneo circulante³¹.

La pared vascular

La pared de los vasos sanguíneos es una estructura heterogénea que está conformada por tres capas fundamentales, cada una de las cuales cuenta con características histológicas, bioquímicas y funcionales específicas:

1. La túnica adventicia es la capa más externa y heterogénea de la pared vascular; es un revestimiento externo de tejido conectivo que se une al tejido perivascular circundante. Esta capa está compuesta por fibras de colágeno con disposición laxa y por varios tipos celulares como fibroblastos, células inmunomoduladoras (dendríticas y macrófagos), células progenitoras, vasos sanguíneos (vasa vasorum), vasos linfáticos y nervios adrenérgicos³⁶. La túnica adventicia funciona como un compartimiento que permite el tráfico de células hacia dentro o fuera de la pared vascular, participa en el crecimiento y reparación de los vasos sanguíneos y media la comunicación entre el endotelio y el músculo liso vasculares³⁷.
2. La túnica media, o capa media, consiste de láminas concéntricas de músculo liso apoyadas en tejido conectivo. Las células de músculo liso vascular se encargan de mantener un tono vascular variable. El tono vascular se define como la actividad contráctil de las células del músculo liso en las paredes de las arterias. El tono vascular es el principal determinante de la resistencia al flujo sanguíneo a través de la circulación. Además, el tono vascular es importante en la regulación de la presión sanguínea y de la distribución del flujo sanguíneo, generado por el bombeo de la sangre entre y dentro de los tejidos y órganos^{38,39}. La regulación de la actividad contráctil en

células de músculo liso vascular es dependiente de estímulos vasodilatadores y vasoconstrictores, los cuales pueden ser hormonas circulantes, neurotransmisores, la presión sanguínea y factores derivados del endotelio. Todas estas señales son integradas por células de músculo liso para determinar la actividad contráctil, el diámetro, y la resistencia de los vasos sanguíneos³⁹. La contracción del músculo liso produce vasoconstricción, dando como resultado una disminución en el diámetro de la luz vascular y por consiguiente del flujo sanguíneo. En cambio, la relajación de estas células musculares o vasodilatación, tiene efectos contrarios a los anteriormente descritos. Las células de músculo liso se caracterizan por la expresión de proteínas contráctiles específicas, de canales iónicos en las membranas citoplásmicas (canales de K⁺, canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, canales de Cl⁻ y canales catiónicos activados por estiramiento), de proteínas encargadas en la regulación de Ca²⁺ y de receptores involucrados en la regulación de la contracción de la célula^{39,40}.

3. La túnica íntima conforma la capa interna de los vasos sanguíneos, se encuentra en contacto directo con la luz vascular y por consiguiente con el torrente sanguíneo. Está constituida por una monocapa de células endoteliales vasculares las cuales están ancladas a una membrana basal que lleva como nombre sistema de anclaje conectivo subendotelial⁴¹. El endotelio de las arterias y venas forma una capa continua de células unidas entre sí por uniones adherentes. El endotelio de los vasos capilares puede ser continuo, fenestrado o discontinuo, dependiendo de las necesidades del tejido subyacente⁴².

Endotelio vascular

Hace algunas décadas, se consideraba al endotelio solamente como una barrera física que permitía detener la coagulación intravascular. Por el contrario, hoy día se sabe que desempeña múltiples funciones elementales para la regulación

del flujo sanguíneo y la homeostasis vascular en general⁴³. Furchgott y Zawadzki en 1980 demostraron que el endotelio vascular es necesario para la relajación inducida por acetilcolina (ACh) en arterias aisladas. Este destacado trabajo llevó al descubrimiento de la vía metabólica de la L-arginina- sintasa de óxido nítrico (NOS), del óxido nítrico (NO) y de su papel como segundo mensajero intercelular, así como al descubrimiento de la importancia del endotelio para la regulación de la presión sanguínea⁴⁴. El NO es clave para el mantenimiento de la vasodilatación basal en los vasos sanguíneos. Este gas se forma a partir de la enzima NOS la cual convierte el aminoácido L-arginina en NO⁴⁵.

El endotelio es un órgano dinámico de secreción autócrina, parácrina y endócrina; es capaz de responder a estímulos ya sea físicos o químicos sintetizando y/o liberando moléculas vasoactivas y trombo-regulatorias⁴⁶. El metabolismo de las células endoteliales es altamente activo y juega un papel crucial en muchos procesos fisiológicos detectando estímulos físicos (estrés mecánico) y/o químicos (moléculas en su entorno), para transformarlos en respuestas adaptativas tales como: procesos anti-trombóticos, modulación del tránsito de macromoléculas como las lipoproteínas, adhesión de leucocitos a la pared arterial y control de la actividad de las células musculares lisas de la túnica media (tono vascular)^{42,46}. Varios compuestos vasoactivos son sintetizados por las células endoteliales, siendo NO, prostaciclina (PGI₂) y EDHF (factor hiperpolarizante derivado de endotelio) algunos de los principales vasodilatadores sintetizados por estas células. Por otro lado, dentro de los vasoconstrictores producidos en el endotelio se destacan endotelina-1, prostaglandinas y TXA₂⁴⁷.

Disfunción Endotelial

La disfunción endotelial es una de las primeras manifestaciones de enfermedad vascular y aterosclerosis. Se define como un desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de factores endoteliales que tienen como función relajar o contraer el músculo liso vascular. Este desequilibrio predispone a la inflamación, a la vasoconstricción y al incremento de la permeabilidad vascular. La disfunción endotelial se manifiesta con una disminución en la vasodilatación dependiente de endotelio o un aumento en la vasoconstricción^{46,48}. La disfunción endotelial es un

factor esencial de la hipertensión y es evidente antes de que se presenten lesiones ateroscleróticas obstructivas en arterias coronarias, por lo que es un marcador pronóstico de futuros eventos cardíacos⁴⁵. Las células endoteliales sanas son capaces de responder a señales químicas y hormonales, y así controlar el tono vascular por medio de la síntesis y liberación de factores vasoactivos. Al haber una pérdida en el equilibrio entre estos factores, se pierde la homeostasis vascular⁴⁶. Se conocen varios posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de la función endotelial, principalmente la disminución de la biodisponibilidad de NO (baja en la producción y/o aumento en la inactivación) así como la acción de un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) en el endotelio⁴⁷.

Efectos del estrés oxidativo en el metabolismo celular

Las ROS y RNS forman parte de una familia de moléculas de vida media muy corta, pero altamente reactivas y oxidativas. Algunos ejemplos de estas son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$)⁴⁹. Las ROS y RNS son producidas por una gran variedad de tipos celulares incluyendo músculo liso y endotelio vascular; estas son generadas por la acción de enzimas de tipo oxidasa, dentro de las cuales se encuentran nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), xantina oxidasa (XO), sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) desacoplada, glucosa oxidasa (GOx), lipooxigenasa (LOX) y las ciclooxigenasas isoformas 1 y 2 (COX-1 y COX-2)⁴⁷. En concentraciones fisiológicas normales, las ROS/RNS llevan a cabo una gran cantidad de efectos biológicos como: defensa contra microorganismos patógenos mediada por el sistema inmune y señalización intracelular. La formación y eliminación de estas especies químicas en la pared vascular debe permanecer en equilibrio para mantener el nivel requerido de especies oxidativas necesarias para las funciones fisiológicas⁵⁰. El estrés oxidativo es causado por una producción excesiva de estas especies. Esto lleva a sobrepasar a los mecanismos antioxidantes de la célula produciendo cambios metabólicos al oxidar y modificar macromoléculas como ADN (ácido desoxirribonucleico), carbohidratos, lípidos, proteínas y enzimas, que puede dar como resultado muerte

celular y daño tisular^{47,51}. El ONOO^- es una especie reactiva de nitrógeno altamente oxidante formada por la reacción entre NO y O_2^- (figura 1). Esta especie es capaz de modificar un gran número de biomoléculas, incluyendo enzimas, al producir la modificación post-traducciona l S-nitrosilación en residuos de tirosina, promoviendo la formación de 3-nitrotirosina en proteínas, así como sulfoxidaciones en los grupos tiol y en residuos de metionina. Por lo anterior un aumento excesivo de este puede dar como resultado alteraciones en la función celular⁵².

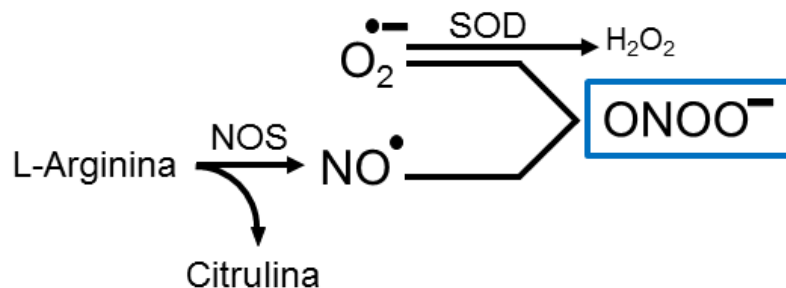


Figura 1) Generación de ONOO^- a partir de NO y O_2^- ; NOS: sintasa de óxido nítrico, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, O_2^- : superóxido, NO : óxido nítrico, ONOO^- : peroxinitrito.

Metabolismo del ácido araquidónico (AA) en células endoteliales

La vía metabólica del ácido araquidónico (AA) por la vía de las ciclooxigenasas (COX) juega un papel importante en la fisiología vascular, ya que a partir de ella se generan numerosos compuestos de tipo prostanoides con efecto vasoactivo. Los compuestos prostanoideos derivados del AA por la vía de las COX se sintetizan por medio de reacciones enzimáticas secuenciales, en respuesta a diferentes estímulos por ejemplo, a citocinas y factores de crecimiento, en condiciones basales⁵³. El primer paso en esta vía es la liberación del AA de fosfolípidos de membrana por la acción de la fosfolipasa A_2 citosólica (cPLA_2), posteriormente las COX-1 y COX-2 actúan sobre el AA, dando lugar a dos modificaciones diferentes: oxigenación para la formación del 9,11-endoperóxido cíclico 15-hidroperóxido G_2 (PGG_2) y peroxidación que transforma a PGG_2 en prostaglan-

dina H₂ (PGH₂). Estos últimos sirven de sustrato para numerosas enzimas terminales y pueden ser transformados en distintos productos vasoactivos. Un ejemplo es el vasoconstrictor tromboxano A₂ (TXA₂), que es sintetizado por la enzima terminal tromboxano sintasa (TXS)⁵⁴ (figura 2). TXA₂ reconoce a los receptor de tromboxano (TP) en musculo liso vascular, media sus efectos a través de la activación del receptor TP acoplado a proteína G dando como resultado una respuesta contráctil⁵⁵. TXA₂ es una molécula de corta vida media pero altamente activa. TXA₂ actúa como autacoide y está involucrado en una gran cantidad de procesos fisiológicos y patofisiológicos como vaso-espamos, trombosis, hipertensión, inflamación e infarto al miocardio^{54,56}. El prostanoide vasodilatador PGI₂ contrarresta el efecto vasoconstrictor y pro-trombótico de TXA₂, lo cual crea un balance en la homeostasis cardiovascular, donde el balance de PGI₂/TXA₂ es crítico.

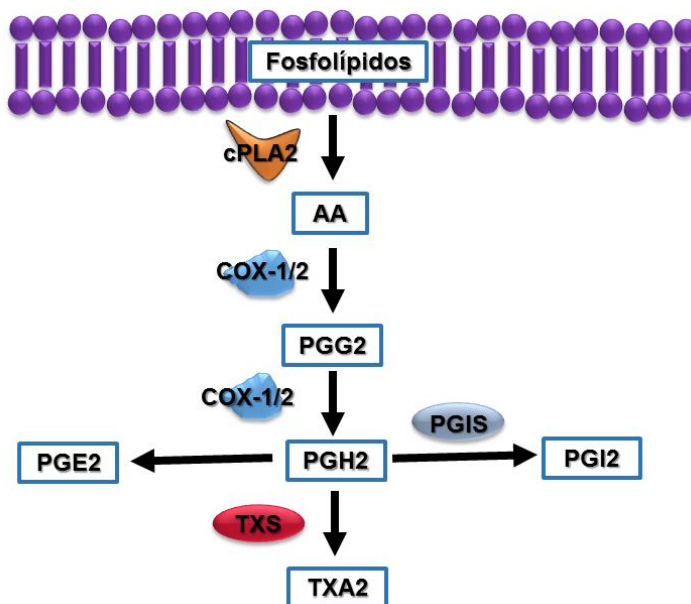


Figura 2) Metabolismo del AA por la vía de las COX; cPLA₂: fosfolipasa A₂ citosólica, AA: ácido araquidónico, COX-1/2: ciclooxigenasas isoformas 1 y 2, PGG₂: 9,11-endoperóxido cíclico 15-hidroperóxido G₂, PGH₂: prostaglandina H₂, PGIS: prostaciclina sintasa, PGE₂: prostaglandina E₂, PGI₂: prostaciclina.

Antecedentes

Se ha demostrado que una alta ingesta crónica de ácidos grasos saturados, estimulan vías metabólicas para la producción de ROS, provocando un aumento del estrés oxidativo sistémico por medio del aumento de ROS⁵⁷, asimismo la obesidad se ha visto asociada con una disminución tanto de la expresión como de la actividad de enzimas que actúan como defensas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión-peroxidasa (GPX) o catalasa⁵⁸. Estas alteraciones metabólicas están fuertemente asociadas con el desarrollo de la disfunción endotelial al presentarse obesidad, ya que se sabe que la obesidad estimula la respuesta vasocontráctil mediada por prostanoideos y se ha observado un pronunciado aumento en la expresión génica del receptor TP, así como un aumento en la expresión de la enzima TXS⁵⁹. En este mismo estudio se observó que la contracción de la vasculatura en respuesta a estímulos farmacológicos con ACh es mediada por la formación de prostanoideos vasoconstrictores sintetizados por las COX⁵⁹. En corazones aislados de ratones obesos, la presión de perfusión en arterias coronarias se ha visto aumentada en respuesta a ACh, y se ha demostrado una vasoconstricción aumentada y una vasorelajación disminuída, comparada con la respuesta obtenida en corazones de ratones control⁶⁰. También se observó un aumento en la liberación de TXA₂ en arterias coronarias y una disminución de la síntesis tanto de prostaciclina, como de NO en el grupo obeso⁶⁰. Estas respuestas se atribuyen al desbalance de sustancias con efecto vasoactivo provocado por el estrés oxidativo, a consecuencia de la obesidad inducida por una dieta alta en grasas, ya que se ha observado un aumento en la presencia de ONOO⁻ y O₂⁻ en aortas de animales obesos⁶⁰. Un posible causante de este desbalance en la síntesis de productos de la vía del AA es el anión ONOO⁻, dado que se ha encontrado que las enzimas COX pueden ser activadas por altas concentraciones de este anión, así como que la enzima PGIS puede ser inhibida por éste, incluso a bajas concentraciones de ONOO⁻ (50 nM), debido a la nitrosilación en diversas condiciones patológicas como en vasos ateroscleróticos^{52,61}.

Justificación

Los antecedentes previamente descritos sugieren que el aumento de estrés oxidativo inducido por la obesidad desencadena trastornos en la respuesta vascular, al haber una alteración del metabolismo de las células endoteliales vasculares, en respuesta al aumento en la producción de ROS/RNS. En particular, el metabolismo del AA por la vía de las COX es muy susceptible al aumento de ROS/RNS, siendo el anión ONOO^- uno de los principales posibles responsables de los cambios observados en esta vía metabólica, la cual juega un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Esto nos conduce a cuestionar y estudiar si se presentan cambios en la respuesta vascular mediados por el metabolito vasoconstrictor TXA_2 en un modelo de obesidad, así como a estudiar la interacción del ONOO^- con el metabolismo de TXA_2 en condición de obesidad.

HIPÓTESIS

- La generación de ONOO^- durante la obesidad estimula el metabolismo del AA por la vía de las COX, produciendo un aumento en la síntesis del metabolito vasoconstrictor TXA_2 .

OBJETIVOS

Objetivo General

Demostrar cambios en el metabolismo del TXA₂ provocados por la obesidad.

Objetivos Particulares

Demostrar el aumento en la vasoconstricción en la circulación coronaria en el grupo obeso.

Demostrar el aumento en la síntesis de TXA₂ en el grupo obeso.

Demostrar la interacción del ONOO⁻ con la vía metabólica del TXA₂ empleando el catalizador de la degradación del ONOO⁻, FeTMPyP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo Experimental

Durante las primeras 5 semanas de edad todos los animales fueron alimentados con dieta estándar, y a partir de la 6^{ta} semana de edad fueron asignados aleatoriamente a uno de los tres grupos experimentales: Control, Obeso u Obeso tratado con FeTMPyP. Las dietas tuvieron una duración de 8 semanas, durante las cuales el tratamiento con FeTMPyP se administró durante 20 días. Al finalizar las 8 semanas, se procedió a extraer el corazón con el fin de observar el efecto de la dieta sobre la respuesta vascular ACh en arterias coronarias y obtener perfusados de las arterias coronarias por medio de la técnica Langendorff para corazón aislado. Se emplearon los perfusados de las arterias coronarias para cuantificar TXB₂ mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El metabolito TXB₂ es estable y biológicamente inactivo. Es producto de la hidratación no enzimática de TXA₂⁶². Asimismo, se extrajo el tejido cardíaco para medir la expresión relativa de la enzima TXS a través de la técnica Western blot (figura 3).

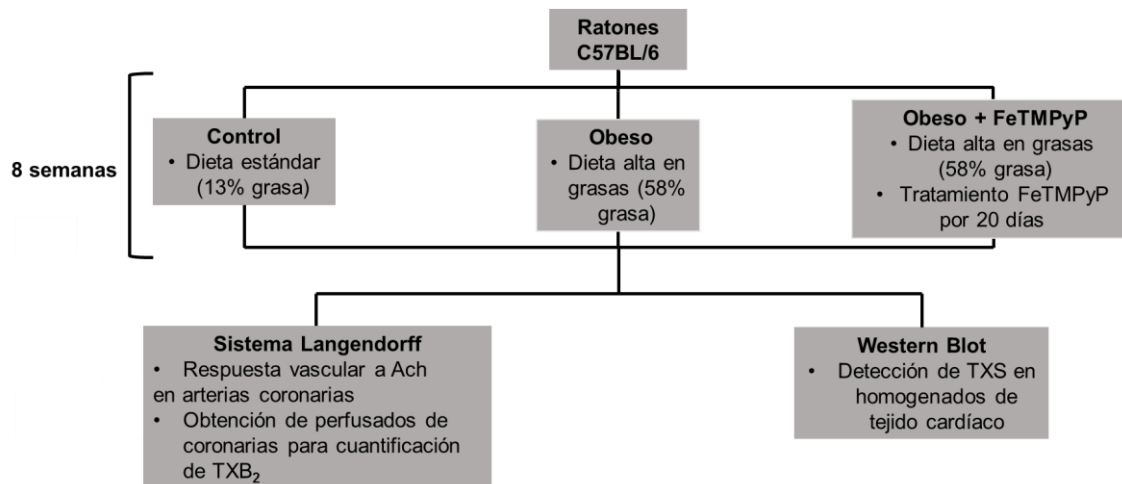


Figura 3) Protocolo experimental.

Animales de experimentación

Se emplearon ratones machos de la cepa C57BL/6 procedentes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (UPEAL-CINVESTAV). Los protocolos para el uso y cuidado de los animales fueron aprobados por el comité de ética del CINVESTAV-IPN. Se les permitió el consumo de agua y alimento ad libitum, fueron mantenidos bajo condiciones de temperatura y luz controladas: 22°C y períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Grupos experimentales

Grupo Control

La dieta consistió en alimento estándar para roedores (Picolab Rodent Diet 20, LabDiet, Land O' Lakes, Minnesota, EE. UU) durante 8 semanas.

Componente de la dieta	% en Kilocalorías
Proteínas	24.496
Carbohidratos	62.380
Grasas	13.123
Total	100

Tabla 1. Composición de la dieta estándar

Grupo Obeso

Se les indujo obesidad por medio de una dieta alta en grasas durante 8 semanas (D12331 Research Diets, New Brunswick, NJ, USA).

Componente de la dieta	% en Kilocalorías
Proteínas	16.4
Carbohidratos	25.5
Grasas	58.0
Total	100

Tabla 2. Composición de la dieta alta en grasas.

Grupo Obeso tratado con FeTMPyP

Se les indujo obesidad por medio de una dieta alta en grasas (D12331 Research Diets, New Brunswick, NJ, USA). durante 8 semanas. Durante los últimos 20 días de la dieta se les administró FeTMPyP, una porfirina sintética acomplejada con hierro, que actúa como catalizador de la degradación de ONOO⁻ (Cayman Chemical, Ann Arbor, EE.UU.). El tratamiento fue aplicado vía intraperitoneal a una dosis diaria de 25 mg por kg de masa corporal, en un volumen de 10 µL de solución salina estéril al 0.9%.

Perfil metabólico y cuantificación de peso corporal

Para determinar las concentraciones de glucosa, colesterol y triglicéridos, se obtuvo sangre de la vena de la cola después de un período de 12 horas de ayuno. Para ello, el animal fue introducido a un dispositivo de inmovilización de fondo plano (Fisher Scientific, Leicestershire, U.K.), se sujetó la cola y se colocó sobre una superficie plana. Posteriormente, se hizo un corte perpendicular en la punta con una hoja estéril de bisturí. Las gotas de sangre se colocaron sobre tiras reactivas para la medición glucosa, triglicéridos y colesterol (Accu Check Performa, Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, EE.UU.; Accutrend Cholesterol y Accutrend Triglycerides, Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, EE.UU.) para obtener las concentraciones de los marcadores metabólicos en equipos de medición de glucosa, colesterol y triglicéridos (AccuCheck Performa y Accutrend GCT, Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, EE.UU.).

La medición del peso corporal se realizó con una balanza electrónica (Scout Pro, OHAUS, New Jersey, EE.UU.).

Medición de la expresión relativa de la enzima TXS

Disección de tejido cardíaco

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilacina/solución salina 0.9% a una proporción de 2:1:1, en un volumen de 2 µl /g de peso corporal. Se realizó un corte torácico-abdominal transversal, posteriormente se

cortó el diafragma para retirar el tejido cardíaco por completo. Se realizó un lavado rápido del tejido con solución salina estéril al 0.9% para eliminar sangre. Los corazones se conservaron en RNAlater (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL, USA) o se almacenaron inmediatamente a -80° hasta su uso posterior.

Homogenización y lisis de tejido cardíaco

El tejido cardíaco fue homogenizado (Tissue Ruptor QIAGEN, Alemania) en buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 137 mM NaCl; 2mM EDTA; NP-40 1%; glicerol 5%) y cóctel de inhibidores de proteasas al 8% v/v (Complete TM, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) con una proporción tejido:buffer de 1:4, manteniendo siempre el tejido en hielo para evitar el calentamiento y la degradación de proteínas. Los homogenizados se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 20 minutos, para después extraer las proteínas solubilizadas presentes en el sobrenadante, este se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

Cuantificación de proteína total por el método del ácido biciconínico (BCA)

La concentración de proteína total de cada homogenizado se determinó mediante el método del ácido biciconínico (BCA) con el kit comercial Pierce BCA Protein Assay Kit de acuerdo al protocolo sugerido (Thermo Scientific Inc, Rockford, IL, USA). Se llevó a cabo una curva de calibración iniciando con una solución de BSA (albúmina sérica bovina) a una concentración de 2000 µg/ml, a partir de esta se realizaron diluciones seriales por triplicado con las siguientes concentraciones: 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml. A su vez, cada muestra se diluyó en proporción 1:50 con tres réplicas de cada muestra. Se utilizó agua bidestilada como blanco y como diluyente tanto para la curva de calibración como para las muestras. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (BioTek Instruments Inc., Winooski, EE.UU.) y se obtuvieron los valores mediante el software KC Junior (BioTek Instruments Inc., Winooski, EE.UU.). Se obtuvo la curva de calibración por medio de una regresión lineal ($R^2 = 0.99$) con base en la cual se calcularon las concentraciones de las muestras.

Separación de proteínas por peso molecular por SDS-PAGE

Las proteínas solubilizadas obtenidas de los homogenizados fueron desnaturalizadas en buffer de muestra (Tris-HCl 0.06 M pH 6.8, SDS 2% v/v, glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1%, 2-mercaptoetanol 5% v/v) y se incubaron a 95-100°C por 5 minutos en un baño seco (Dri Bath type 17600, Thermolyne). Posteriormente, se mantuvieron en hielo. Para la electroforesis desnaturizante, se empleó una solución de 30% acrilamida p/v y 0.8% bisacrilamida p/v, a partir de la cual se preparó el gel separador al 8% de resolución (1.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, persulfato de amonio 10%, TEMED) y el gel concentrador al 5% (0.5 M Tris-HCl, 0.4% SDS, persulfato de amonio 10% p/v, TEMED) y se utilizó buffer de migración estándar (25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1% SDS). Se depositaron 100 µg de cada muestra por pozo en el gel, las cuales fueron separadas a la par de un marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad Laboratories Inc, EE. UU). Se aplicó una corriente eléctrica de 90 Volts durante 2 horas (Electrophoresis power supply EPS 301, Amersham Biosciences, U.K.).

Electrotransferencia de las proteínas

Una vez que las proteínas fueron separadas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) (Hybond-P, Amersham, Buckinghamshire, UK) mediante un sistema de transferencia semi-seca (Trans-Blot SD Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories Inc, EE.UU.) a 15 volts por 1 hora. La adecuada transferencia se observó mediante la tinción de las proteínas de membrana con rojo de Ponceau (Ponceau S 0.1%p/v, 5% v/v ácido acético).

Western Blot

Los espacios libres de proteína en las membranas fueron bloqueados con leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé) al 5% p/v disuelta en TBST, y se incubaron por 4 horas en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se removió el exceso de leche enjuagando las membranas con TBST durante 10 minutos en agitación. Para la detección de la proteína de interés (TXS) y el control de carga

(Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, GAPDH), las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios IgG de conejo anti-TXS (dilución 1: 1,000) e IgG de ratón anti-GAPDH (dilución 1: 5,000) (Abcam, Cambridge, UK). Los anticuerpos fueron disueltos en una solución de leche descremada al 2.5% p/v disuelta en TBST. Las membranas se incubaron por 16 horas a 4°C en agitación. Para remover el exceso de anticuerpos, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBST. Para la detección de los anticuerpos primarios, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (Abcam, Cambridge, UK) IgG de cabra anti-ratón (dilución 1: 10,000) e IgG de cabra anti-conejo (dilución 1: 10,000). Los anticuerpos fueron diluidos en leche-TBST al 2.5%. Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno para remover el exceso de anticuerpos. Para la detección de los anticuerpos secundarios unidos, se utilizó el sistema *Super-Signal West* (Pierce, Rockford, IL) que contiene ECL, el sustrato de quimioluminiscencia mejorada de la peroxidasa. Las membranas tratadas con el sistema fueron expuestas entre 30 segundos a 1 minuto. Las bandas generadas por la quimioluminiscencia se cuantificaron por densitometría por medio del software ImageJ (NIH).

Evaluación de la respuesta vascular a ACh en arterias coronarias

Extracción de corazón

Los ratones fueron anestesiados con una solución de ketamina/xilacina/solución salina 0.9% a una proporción de 2:1:1, en un volumen de 2 µl por cada gramo de peso corporal, y se inyectaron 100 UI de heparina para evitar la formación de trombos. Todas las inyecciones se realizaron vía intraperitoneal. Los ratones fueron intubados y ventilados mecánicamente a un volumen de 1.5 ml. Se realizó una incisión trans-abdominal para exponer el diafragma, el cual posteriormente fue cortado para tener acceso a la cavidad torácica y al corazón. Se localizó el arco de la aorta ascendente para mantener esta porción de la arteria intacta. Posteriormente se extrajo el corazón eliminando pulmones y tejido conectivo. Inmediatamente se colocó el corazón en buffer Krebs-Henseleit (117.8mM NaCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 6.0

mM KCl, 1.6 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 0.027 mM Na₂ EDTA, 5.5 mM glucosa y 24.2 mM NaHCO₃) previamente enfriado en hielo. Se eliminó tejido adiposo, y bajo un estereoscopio se localizó y se canuló la aorta. Se eliminó la sangre de las arterias coronarias con Buffer Krebs-Henseleit.

Técnica Langendorff para corazón aislado

Una vez canulada la aorta, el corazón se colocó en el sistema Langendorff, mediante el cual se perfundió Buffer Krebs-Henseleit (oxigenado 95% O₂, 5% CO₂; atemperado a 37°C) de manera retrógrada por medio de una bomba peristáltica. Se verificó que el corazón latiera de manera espontánea permitiendo la estabilización de la presión de las coronarias durante 30 minutos. La presión de perfusión de las coronarias (PPC) se monitoreó mediante un transductor de presión conectado a un sistema de adquisición de datos. Una vez que la presión se estabilizó, las arterias coronarias fueron estimuladas mediante la adición de ACh (12 µM en un volumen total de 10 µL) por medio de una microjeringa (Hamilton).

Cuantificación de TXB₂ a partir de perfusados de arterias coronarias

Obtención de perfusados de arterias coronarias

Los perfusados fueron obtenidos a partir de los corazones montados en el sistema Langendorff, como fue descrito anteriormente. Una vez que la PPC se mantuvo estable, se tomaron muestras del perfusado liberado por las arterias coronarias en condiciones basales (sin estimular con ACh) en un tubo *Eppendorf*. Después, las coronarias fueron estimuladas con ACh (12 µM) e inmediatamente se tomaron muestras del perfusado, específicamente durante los instantes correspondientes a los valores máximos de PPC alcanzados. Se identificó cada muestra y se registraron los puntos en la curva producida por el estímulo de ACh correspondientes a cada muestra. Los perfusados fueron mantenidos en hielo para posteriormente almacenarlos a -80°C, hasta su uso posterior.

ELISA

Se empleó el *kit Thromboxane B₂ ELISA Kit* (ab133022, Abcam, Cambridge, UK) de tipo competitivo siguiendo las instrucciones y recomendaciones indicadas por el fabricante. Este inmunoensayo para la cuantificación de tromboxano B₂ (TXB₂) emplea un anticuerpo policlonal contra TXB₂ adherido a la superficie de los pozos de la microplaca, que se une de manera competitiva a TXB₂ presente ya sea en la muestra o a TXB₂ unido covalentemente a la enzima fosfatasa alcalina (proveído por el fabricante). Se incubaron las muestras, controles y estándares de manera simultánea por 3 horas, a temperatura ambiente y en agitación (300 rpm). Posteriormente, se removió el exceso de reactivos y se realizaron tres lavados. Se agregó para-Nitrofenilfosfato (pNPP). Dicho compuesto es el sustrato de la fosfatasa alcalina, al ser hidrolizado por ésta enzima, se produce para-nitrofenol, que presenta una coloración amarilla⁶³. La absorbancia fue leída a una longitud de onda de 405 nm en un lector de microplacas (BioTek Instruments Inc., Winooski, EE.UU.). Debido a que se trata de un ELISA competitivo, la intensidad de la coloración en cada pozo es inversamente proporcional a la cantidad de TXB₂ presente

en la muestra capturada en los pozos⁶². Los valores se obtuvieron mediante el software KC Junior (BioTek Instruments Inc., Winooski, EE.UU.). Se linealizó la curva estándar por medio de una transformación logit ($R^2 = 0.99$), a partir de esta curva se calcularon las concentraciones de las muestras.

Análisis estadísticos

Tanto como para los resultados obtenidos de Western Blot y de ELISA se realizaron análisis de varianza mediante ANOVA de una vía y análisis *post-hoc* Tukey. Se utilizó un valor de significancia estadística de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Efectos de la dieta alta en grasas en la respuesta vascular de las arterias coronarias

Con el propósito de observar la respuesta vascular en las arterias coronarias, se utilizó el sistema Langendorff de perfusión retrógrada para corazón aislado, mediante el cual se registró la presión de perfusión coronaria (PPC) ante estímulos con ACh. En la figura 4 se muestra un registro representativo de la PPC en función del tiempo para el grupo Control, en la que se puede observar una respuesta vasoconstrictora, alcanzando el mayor valor de PPC (89 mmHg) 27 segundos después del estímulo. En el registro representativo correspondiente al grupo obeso (figura 5) se observa un aumento en la vasoconstricción, alcanzando un máximo valor de PPC de 127 mmHg 20 segundos después del estímulo. En el registro representativo del grupo Obeso + FeTMPyP (figura 6), donde el anión ONOO^- fue disminuído, se observa un aumento en la vasoconstricción con valor máximo de 59 mmHg 12 segundos después del estímulo. La vasoconstricción en arterias coronarias de corazón aislado inducida por ACh se vio aumentada en los ratones obesos comparada con la observada en los ratones control. Al aumentar la degradación de ONOO^- por medio del tratamiento con FeTMPyP se redujo el efecto vasoconstrictor provocado por la obesidad tras el estímulo de ACh.

Control

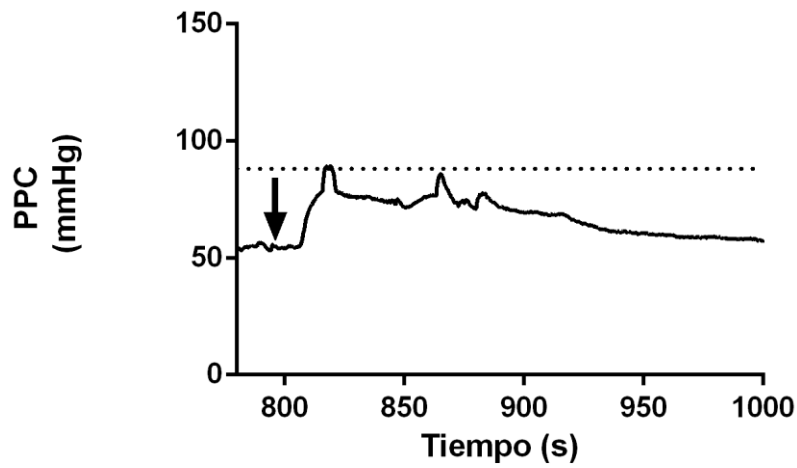


Figura 4) Registro representativo de la respuesta vascular (mmHg) del grupo Control en función del tiempo (segundos) tras un estímulo de ACh (12 μ g). La flecha indica el momento de la adición de ACh. La línea punteada señala el nivel de máxima contracción tras el estímulo.

Obeso

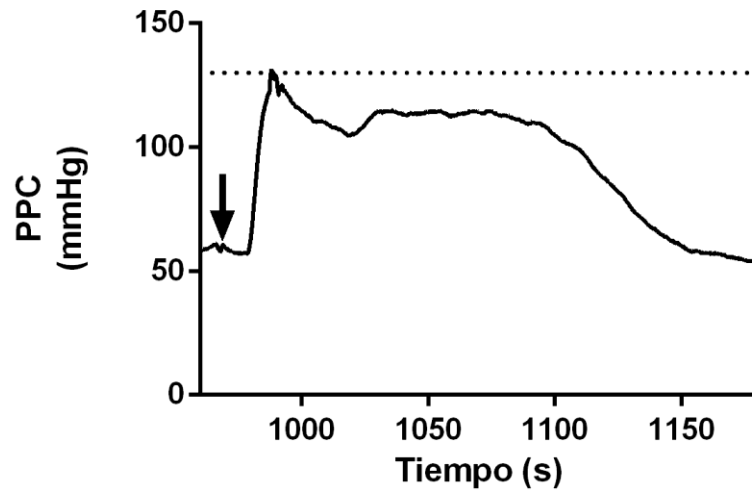


Figura 5) Registro representativo de la respuesta vascular coronaria (mmHg) del grupo Obeso tras un estímulo de ACh (12 μ g) en función del tiempo (segundos). La flecha indica el momento de la adición de ACh. La línea punteada señala el nivel de máxima contracción tras el estímulo.

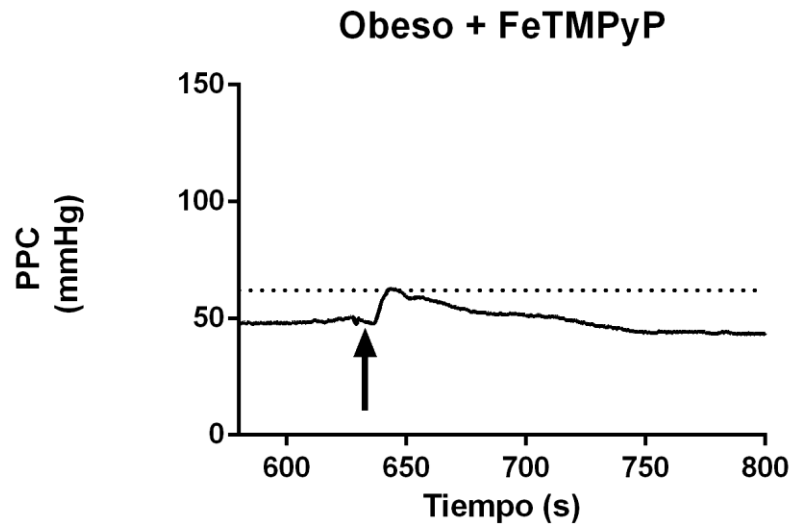


Figura 6) Registro representativo de la respuesta vascular coronaria (mmHg) del grupo Obeso tratado con FeTMPyP tras un estímulo de ACh (12 μ g) en función del tiempo (segundos). La flecha indica el momento de la adición de ACh. La línea punteada señala el nivel de máxima contracción tras el estímulo.

Efecto de la ACh en la liberación de TXA₂ en circulación coronaria

Debido a que la vida media de TXA₂ es muy corta, de tan sólo 37 segundos en condiciones fisiológicas, la síntesis de este metabolito fue monitoreada por la producción TXB₂. La medición de TXB₂ se hizo a partir de perfusados de arterias coronarias obtenidos de corazones montados en el sistema Langendorff de perfusión retrógrada. La cuantificación de TXB₂ se realizó a partir de muestras correspondientes a los niveles de mayor vasoconstricción de arterias estimuladas con ACh, así como a la condición basal (arterias sin estimular). Se observó (figura 7) que la liberación de TXB₂ de las arterias coronarias en condiciones basales no varió entre los grupos Control, Obeso y Obeso + FeTMPyP. Sin embargo, la liberación de TXB₂ durante la vasoconstricción inducida por ACh fue significativamente mayor en el grupo Obeso en comparación con los propios niveles basales, aproximadamente y tres veces mayor comparada con la del grupo Control estimulado con ACh. En contraste, se observó una reversión en el aumento de síntesis de TXB₂ estimulada por ACh en el grupo Obeso + FeTMPyP, ya que no se observaron diferencias en los niveles de este grupo en comparación con el grupo Control.

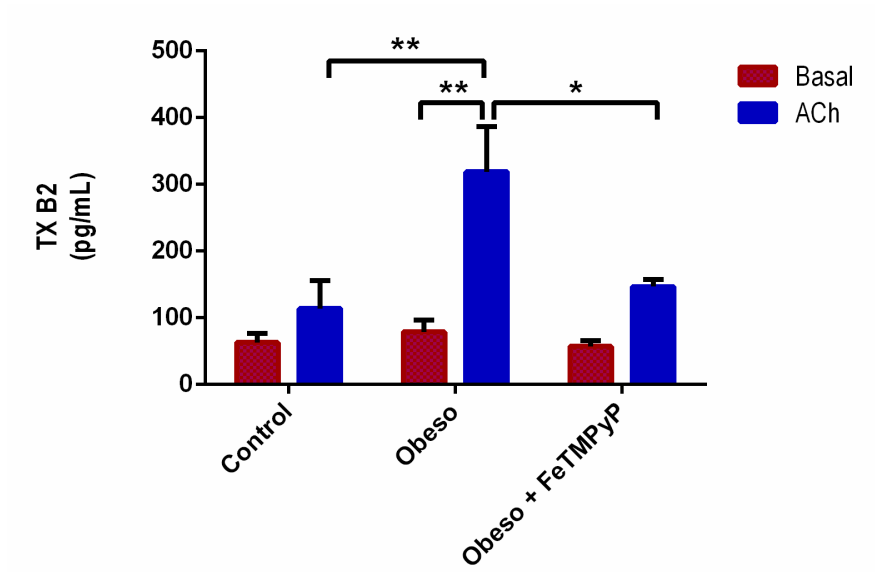


Figura 7) Liberación de TXA₂ en arterias coronarias. Cuantificación de la concentración de TXB₂ por medio de ELISA, a partir de perfusados de arterias coronarias de los grupos Control, Obeso y Obeso + FeTMPyP. Se muestran las concentraciones correspondientes a la condición basal y a las fases de máxima contracción tras el estímulo de ACh. Las barras representan la media de las concentraciones expresadas en pg/mL (\pm error estándar de la media), $n=4-6$ por grupo. Las comparaciones se realizaron entre cada condición de los grupos experimentales (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$).

Efecto de la obesidad en la expresión de TXS

Se realizaron ensayos de Western blot para medir la expresión relativa de la enzima TXS, que presenta un peso molecular de 61 KDa, empleando como control de carga la enzima de expresión constitutiva GAPDH de un peso molecular de 35 KDa, a partir de homogenados de tejido cardíaco de los grupos Control, Obeso y Obeso + FeTMPyP (figura 8). Se midió la densidad de las bandas a partir de las imágenes digitales obtenidas en unidades arbitrarias. Los valores de GAPDH se emplearon para normalizar los valores de la proteína de interés TXS. La expresión de TXS se vio fuertemente afectada por la obesidad puesto que aumentó significativamente comparado con el grupo control. En cambio, se observó una reducción en la expresión de TXS como consecuencia de la catálisis de la degradación de ONOO⁻ por medio del tratamiento con FeTMPyP.

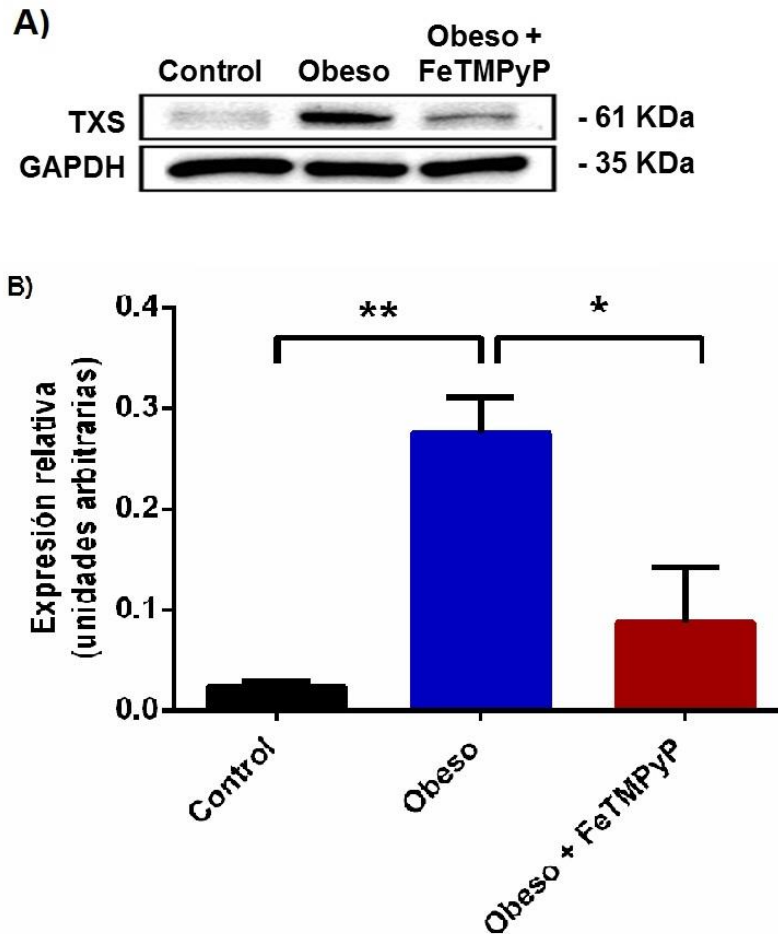


Figura 8) Niveles de expresión relativa de TXS en corazón. A) Bandas representativas de la detección de TXS (61 KDa) por Western blot. Se empleó a GAPDH (35 KDa) como control de carga. B) Análisis de densitometría de las imágenes. Las barras representan la media (\pm error estándar de la media) del cociente de densidad de banda entre TXS y GAPDH, expresado en unidades arbitrarias correspondientes a los grupos Control, Obeso y Obeso + FeTMPyP; $n=4$ ratones por grupo. Las comparaciones se realizaron entre cada uno de los grupos experimentales ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$).

DISCUSIÓN

En este proyecto se trabajó con un modelo de obesidad en ratones C57BL/6, donde la obesidad fue inducida con una dieta alta en grasas saturadas hidrogenadas durante 8 semanas. La cepa C57BL/6 ha mostrado susceptibilidad a desarrollar a altas tasas de obesidad con dietas altas en grasas, y presenta alteraciones metabólicas similares a las de la obesidad en humanos, tales como intolerancia a la glucosa⁶⁴, hiperinsulinemia⁶⁵, hiperglicemia y alteraciones en la respuesta vascular (mayor vasoconstricción)⁶⁶. Anteriormente se había reportado que este modelo de obesidad resultó adecuado para el estudio de mecanismos involucrados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares durante el desarrollo de la obesidad en fases tempranas, como la disfunción endotelial previa al establecimiento de disfunción cardíaca⁶⁰. En cuanto a la respuesta vascular, en este trabajo se observó que la respuesta dependiente de endotelio estimulada con 12 μM de ACh en arterias coronarias produjo una fase inicial de vasoconstricción, para posteriormente regresar a la presión basal. Ésta respuesta se observó tanto en corazones de ratones control como en obesos. La concentración de ACh empleada no indujo la suficiente vasodilatación para generar una PPC por debajo de la basal tras el estímulo de ACh, como se esperaría⁶⁰. Sin embargo, el aumento de la vasoconstricción durante la fase de contracción alcanzada en obesos fue notablemente mayor en comparación con los controles, tal como ha sido mostrado previamente con en éste modelo de obesidad⁶⁰. Este aumento en la vasoconstricción en corazón de ratones obesos podría deberse principalmente al aumento en la producción de ROS/RNS en el endotelio, principalmente de O_2^- y ONOO^- . Anteriormente se había demostrado que la obesidad propicia el impedimento de la función endotelial, lo cual se ha asociado con el aumento de la generación de O_2^- por la enzima NADPH oxidasa mitocondrial en la vasculatura, tanto en modelos de obesidad inducida por dietas altas en grasas en ratones tipo silvestre⁶⁷ así como en ratas genéticamente obesas (*fa/fa*)⁶⁸. Por otro lado, el aumento de la producción de O_2^- pudiera estar directamente relacionado al aumento en la generación de ONOO^- en los vasos sanguíneos, debido que este último se genera a partir de la interacción de NO y O_2^- . A su vez esto reduce la biodisponibilidad de NO debido a la interacción con O_2^- ^{69,70}. Estudios

experimentales han demostrado el aumento en la producción de ONOO^- durante diversas patologías como isquemia cerebral⁷¹ y fallo cardíaca experimental⁷² y artritis⁷³ por lo que es considerado como un agente importante en el desarrollo de enfermedades asociadas con la producción de NO y con el aumento en la formación de O_2^- . En este estudio observamos que el tratamiento con FeTMPyP, una porfirina que cataliza la degradación de ONOO^- , impidió el aumento de la vasoconstricción dependiente de endotelio en respuesta a ACh observado en ratones obesos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios en los que el uso de FeTMPyP para la regular la degradación de ONOO^- ha permitido restaurar la vasorrelajación dependiente de endotelio con aumento de estrés nitrosativo efectuado por ONOO^- en ratas de edad avanzada⁷⁴. Se conoce que el anión ONOO^- es un oxidante capaz de modificar biomoléculas, incluyendo aminoácidos como tirosina, cisteína, triptófano y metionina, así como grupos prostéticos de proteínas, lo cual puede afectar directamente la cadena peptídica provocando cambios conformacionales y funcionales⁷⁵. El anión ONOO^- inactiva la función catalítica de una gran variedad de enzimas incluyendo a las COX⁷⁶. Se ha demostrado en estudios *in vitro* que ONOO^- es capaz tanto de activar a concentraciones en el rango de nM, como de inactivar en rangos de μM a las COX⁷⁷. Asimismo, otros estudios han demostrado que las COX y TXS son activadas por altas concentraciones de este anión en vasos ateroscleróticos⁶¹. En cuanto a la expresión relativa de la enzima terminal de la vía de las COX, TXS, donde se observó un aumento en ratones obesos y una disminución en el grupo obeso tratado con FeTMPyP, comparando con respecto a la expresión en los ratones control. De acuerdo a esto se puede inferir que el aumento de ONOO^- provocado por la obesidad, podría estar efectuando cambios post-traduccionales en TXS permitiendo la activación y/o evitando la degradación proteolítica de esta.

Por otro lado, observamos el aumento en la liberación de TXA_2 estimulada por ACh en la circulación coronaria de ratones obesos. Estas observaciones concuerdan con estudios recientes en los cuales se ha mostrado que el aumento de producción de TXA_2 y el aumento en el estrés oxidativo, por ONOO^- y O_2^- vía NOX propician un incremento en la vasoconstricción⁷⁸. En ratones obesos tratados con FeTMPyP, los niveles de TXB_2 fueron notablemente reducidos. Esto

confirmaría que el anión ONOO^- estimula la vía del AA mediante las COX y por consiguiente la síntesis de TXA_2 , así como en el aumento de la síntesis de TXA_2 en enfermedades relacionadas a disfunción endotelial.

Con base en los resultados obtenidos, es posible afirmar que otro posible causante del aumento en la vasoconstricción en individuos obesos es el vasoconstrictor TXA_2 . De igual manera, la obesidad y el aumento de estrés oxidativo causado por éste, podrían estar promoviendo la respuesta vasoconstrictora por medio de la prevalencia de diversos factores no considerados en este trabajo, promoviendo indirectamente la expresión a nivel génico de enzimas de la vía de las COX, como TXS, COX o de diversos factores relacionados con el control del tono vascular.

Conclusiones

A partir de nuestros resultados podemos concluir que el anión ONOO^- afecta la vía de las COX al incrementar la síntesis de TXA_2 por medio de un aumento en la expresión de la enzima TXS en las células endoteliales, siendo el TXA_2 un importante factor que contribuye al aumento de la vasoconstricción característica de la obesidad y de la disfunción endotelial.

Perspectivas

Un reto a futuro sería observar los cambios generados por ONOO^- en condiciones de obesidad en la síntesis del vasodilatador PGI_2 y en la expresión de las enzimas PGIS y COX-1 y COX-2, empleando este modelo de obesidad. Asimismo, sería interesante elucidar los mecanismos mediante los cuales la obesidad está provocando el aumento en la producción de ROS/RNS en el endotelio vascular.

Por otro lado, aún es necesario elucidar los mecanismos mediante los cuales las ROS/RNS en condiciones de estrés oxidativo, como en la obesidad, modifican el metabolismo del AA, específicamente los cambios generados a nivel de señalización celular.

Referencias

1. Mudau, M., Genis, A., Lochner, A. & Strijdom, H. Review Article Endothelial dysfunction : the early predictor of atherosclerosis. **23**, 222–231 (2012).
2. Versari, D., Daghini, E., Viridis, A., Ghiadoni, L. & Taddei, S. THEMED SECTION: ENDOTHELIUM IN PHARMACOLOGY REVIEW Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 527–536 (2009).
3. Perticone, F. *et al.* Prognostic Significance of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients.
4. Tapia Conyer, R. *Manual para la prevención, promoción de la salud y tratamiento de la obesidad.* (2003).
5. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **894**, i–xii, 1–253 (2000).
6. Svarch, A. Obesidad (1° parte). *Rev Mex Pue y Ped* **10**, 83–90 (2003).
7. Cervera, S. & Campos, I. Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. ... *Médica México* 397–407 (2010).
8. de este número, Í. *et al.* Otras secciones de este sitio: La grasa visceral y su importancia en obesidad *Revista de Endocrinología y Nutrición* La grasa visceral y su importancia en obesidad. *Rev. Endocrinol. y Nutr. Julio-Septiembre* **10**, 121–127 (2002).
9. Hruby, A. & Hu, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **33**, 673–89 (2015).
10. Lee, M.-J., Wu, Y. & Fried, S. K. Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol. Aspects Med.* **34**, 1–11 (2013).

11. Després, J. P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: An update. *Circulation* **126**, 1301–1313 (2012).
12. Jensen, M. D. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, S57–63 (2008).
13. Luis, P. & Velasco, D. E. P. Revisión. Significado clínico de la obesidad abdominal CLINICAL SIGNIFICANCE OF. *Rev. Española Endocrinol. y Nutr.* **54**, 265–271 (2007).
14. Feng, X. *et al.* PTPRT regulates high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *PLoS One* **9**, e100783 (2014).
15. Wright, S. M. & Aronne, L. J. Causes of obesity. *Abdom. Imaging* **37**, 730–732 (2012).
16. Harmancey, R., Wilson, C. R., Wright, N. R. & Taegtmeyer, H. Western diet changes cardiac acyl-CoA composition in obese rats: a potential role for hepatic lipogenesis. *J. Lipid Res.* **51**, 1380–93 (2010).
17. Schrauwen, P. & Westerterp, K. R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight 191. *Br J Nutr* **84**, 417–427 (2000).
18. Sonne-Holm, S. & Sørensen, T. I. A. Post-War course of the prevalence of extreme overweight among Danish young men. *J. Chronic Dis.* **30**, 351–358 (1977).
19. Lissner, L. & Heitmann, B. L. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur. J. Clin. Nutr.* **49**, 79–90 (1995).
20. Rivera Dommarco, J. Á. *Obesidad en México: recomendaciones para una política de Estado.* (2013). doi:ISBN: 978-607-02-4478-0
21. Poirier, P. *et al.* Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 968–976 (2006).

22. Martinez, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc. Nutr. Soc.* **59**, 337–345 (2000).
23. Pérusse, L. *et al.* The Human Obesity Gene Map: The 2004 Update. *Obes. Res.* **13**, 381–490 (2005).
24. Atkinson, R. L. Etiologies of Obesity. *Nutr. Health* 105–118 (2005).
25. WHO | Obesity and overweight. *WHO* (2016).
26. WHO. WHO | Obesity and overweight. *World Health Organisation Media Centre Fact Sheet No. 311* (2012). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/#.U2gDIH5zIZ4.mendel ey>.
27. Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A. & Rivera-Dommarco, J. A. Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Publica Mex.* **55**, 151–160 (2013).
28. Instituto Mexicano para la Competitividad. Kilos de mas, pesos de menos. Los costos de la obesidad en México. *January* 46 (2015).
29. Rtveldze, K. *et al.* Obesity prevalence in Mexico: impact on health and economic burden. *Public Health Nutr.* **17**, 233–239 (2014).
30. Mensah, G. A. *et al.* Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: emerging epidemics and their cardiovascular implications. *Cardiol Clin* **22**, 485–504 (2004).
31. Grundy, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2595–600 (2004).
32. Haslam, D. W. & James, W. P. T. Obesity. in *Lancet* **366**, 1197–1209 (2005).
33. Hubert, H. B., Feinleib, M., McNamara, P. M. & Castelli, W. P. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of

- participants in the Framingham Heart Study. *Circ.* **67** , 968–977 (1983).
34. Garza, C. A. *et al.* Major weight loss prevents long-term left atrial enlargement in patients with morbid and extreme obesity. *Eur. J. Echocardiogr.* **9**, 587–593 (2008).
 35. Lavie, C. J. *et al.* Impact of Obesity and the Obesity Paradox on Prevalence and Prognosis in Heart Failure. *JACC Hear. Fail.* **1**, 93–102 (2013).
 36. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 23–47 (2013).
 37. Majesky, M. W., Dong, X. R., Hoglund, V., Mahoney, W. M. & Daum, G. The Adventitia: A Dynamic Interface Containing Resident Progenitor Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1530–1539 (2011).
 38. Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. & Michel, J.-B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* **95**, 194–204 (2012).
 39. Jackson, W. F. Ion channels and vascular tone. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **35**, 173–8 (2000).
 40. Metz, R. P., Patterson, J. L. & Wilson, E. Vascular smooth muscle cells: isolation, culture, and characterization. *Methods Mol. Biol.* **843**, 169–76 (2012).
 41. Garrido Jiménez, J. M. Aterosclerosis y disfunción endotelial. Evaluación de la terapia con estatinas en patología cardiovascular. (Universidad de Granada, 2009).
 42. Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
 43. Esper, R. J. *et al.* Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc. Diabetol.* **5**, 4 (2006).

44. Félétou, M., Huang, Y. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 894–912 (2011).
45. Sandoo, A., van Zanten, J. J. C. S. V., Metsios, G. S., Carroll, D. & Kitas, G. D. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc. Med. J.* **4**, 302–12 (2010).
46. Badimón, L. & Martínez-González, J. Disfunción endotelial. *Rev. Española Cardiol.* **6**, 21–30 (2006).
47. Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. & Kihara, Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* **73**, 411–418 (2009).
48. Pérez Ruiz, A., Rodríguez Calzadilla, A., Sanjurjo Gómez, V. M. & Padrón Chacón, R. El papel de óxido nítrico en la hemodinámica, hemostasia e inflamación. *Rev. Cubana Estomatol.* **34**, 84–86
49. Yung, L. M., Leung, F. P., Yao, X., Chen, Z.-Y. & Huang, Y. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* **6**, 1–19 (2006).
50. Schildknecht, S. & Ullrich, V. Peroxynitrite as regulator of vascular prostanoid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**, 183–189 (2009).
51. Savini, I., Catani, M. V., Evangelista, D., Gasperi, V. & Avigliano, L. Obesity-associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 10497–10538 (2013).
52. Zou, M. H. Peroxynitrite and protein tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **82**, 119–127 (2007).
53. Majed, B. H. & Khalil, R. A. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn. *Pharmacol. Rev.* **64**, 540–82 (2012).

54. Nakahata, N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **118**, 18–35 (2008).
55. Félétou, M., Köhler, R. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: Possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr. Hypertens. Rep.* **12**, 267–275 (2010).
56. Bauer, J. *et al.* Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 3115–31 (2014).
57. Matsuzawa-Nagata, N. *et al.* Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* **57**, 1071–1077 (2008).
58. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–61 (2004).
59. Traupe, T. *et al.* Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor gene expression. **1**, 2239–2245
60. Gamez-Mendez, A. M., Vargas-Robles, H., Ríos, A. & Escalante, B. Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
61. Zou, M., Martin, C. & Ullrich, V. Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite. *Biol. Chem.* **378**, 707–13 (1997).
62. Thromboxane B2 ELISA Kit Instructions for Use - ab133022. Available at: [http://www.abcam.com/ps/products/133/ab133022/documents/ab133022 Thromboxane B2 ELISA Kit v2 \(website\).pdf](http://www.abcam.com/ps/products/133/ab133022/documents/ab133022%20Thromboxane%20B2%20ELISA%20Kit%20v2%20(web%20site).pdf). (Accessed: 30th August 2016)
63. 1-Step PNPP Substrate Solution - Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/37621>.

64. Zhao, X. *et al.* Trans-Fatty Acids Aggravate Obesity, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in C57BL/6 Mice, Possibly by Suppressing the IRS1 Dependent Pathway. *Molecules* **21**, 705 (2016).
65. Mehran, A. E. *et al.* Hyperinsulinemia Drives Diet-Induced Obesity Independently of Brain Insulin Production. *Cell Metab.* **16**, 723–737 (2012).
66. Calligaris, S. D. *et al.* Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* **8**, e60931 (2013).
67. Lynch, C. M. *et al.* Nox2-derived superoxide contributes to cerebral vascular dysfunction in diet-induced Obesity. *Stroke* **44**, 3195–3201 (2013).
68. Serpillon, S. *et al.* Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H153–62 (2009).
69. Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* **271**, C1424–37 (1996).
70. Schildknecht, S. *et al.* Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A2 formation and aggregation in human platelets. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 512–20 (2008).
71. Fukuyama, N. *et al.* Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 123–9 (1998).
72. Mihm, M. J., Coyle, C. M., Schanbacher, B. L., Weinstein, D. M. & Bauer, J. A. Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc. Res.* **49**, 798–807 (2001).
73. Szabó, C. *et al.* Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and

arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3867–72 (1998).

74. Sun, Q. *et al.* Anti-Peroxynitrite Treatment Ameliorates Vasorelaxation of Resistance Arteries in Aging Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1** (2016). doi:10.1097/FJC.0000000000000420
75. Warshakoon, H. Analysis of Peroxynitrite-mediated Post-translational Modifications of Caveolin-1. (University of Kansas, 2006).
76. Landino, L. M., Crews, B. C., Timmons, M. D., Morrow, J. D. & Marnett, L. J. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15069–74 (1996).
77. Schildknecht, S. *et al.* Endogenous peroxynitrite modulates PGHS-1-dependent thromboxane A₂ formation and aggregation in human platelets. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 512–520 (2008).
78. Yasuda, Y. *et al.* High oxygen modifies vasodilator effect of cysteine via enhanced oxidative stress and thromboxane production in the rat mesenteric artery. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **468**, 1555–1564 (2016).