



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

Unidad Monterrey

**IMPACTO DE LA OBESIDAD EN EL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO
EN LA CIRCULACIÓN CORONARIA**

Tesis que presenta:

Lesvia Karina Alvarado Coutiño

Para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Monterrey, Nuevo León

Agosto 2017

Impacto de la obesidad en el metabolismo del ácido araquidónico en la circulación coronaria

© Lesvia Karina Alvarado Coutiño, 2017.

Asesor: Dr. Bruno A. Escalante Acosta

Sinodal: Dr. Daniel P. Sánchez Herrera

Sinodal: Dr. Jesús G. Rodríguez González

Tesis de Maestría 2017

Centro de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV)

México Nuevo León

Telefono: 01 81 1156 1740

Abstract

Obesity has become a worldwide health problem and has been associated with the development of cardiovascular diseases, including coronary heart disease and stroke. Arachidonic Acid (AA) is a membrane lipid, thus, is metabolized to eicosanoids that includes prostaglandins, thromboxane, and leukotrienes. Dysregulated production of eicosanoids underlies the pathogenesis of many diseases. Furthermore, recent studies demonstrated that AA-derived eicosanoids are important for adipocyte differentiation *in vivo*. Also, oxylipids resultant from Cytochrome P450-dependent metabolism of polyunsaturated fatty acids have been associated with obesity-related pro-oxidative stress and increased ROS, this supports the idea that AA metabolism is associated to endothelium response in obesity. Recently, we have reported increased coronary vasoconstrictor responses in obese mice and the initial characterization suggested that changes in nitric oxide metabolism were the responsible for the vascular responses. However, an indomethacin-dependent response was observed in preliminary experiments suggesting that arachidonic acid (AA) metabolism may be involved in the changes in vascular responses observed during obesity. Therefore, in the present study, we investigated the impact of obesity in the metabolism of AA in coronary circulation. C57BL/6 mice (68 weeks) were fed with standard (control) or high fat diet (HFD) for 8 weeks. The Langendorff isolated perfused heart system was used to evaluate changes in coronary perfusion pressure (CPP). After injection of an AA bolus (30 μ g), CPP was recorded and perfusate was collected to quantify TXB2 and PGI2 by ELISA in both control and HFD mice. Immediately after perfusion, hearts were quickly frozen and thromboxane synthase (TXS) was measured by western blot, as well as COX-1 and COX-2. AA administration elicited an enhanced contractile response in HFD mice coronary arteries compared with control group. Also, coronary TXB2 release was increased in HFD compared with control perfusate, while PGI2 synthesis was similar in both groups. These results suggest that TXA2 leads the imbalance in the production of vasorelaxing and vasoconstrictor agents during obesity with the consequent increase in blood pressure.

Resumen

La obesidad ha sido asociada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares incluyendo enfermedad cardiaca y accidentes cerebrovasculares. Recientemente, nuestro grupo ha reportado un incremento en la respuesta vasoconstrictora coronaria en ratones obesos relacionada con el metabolismo del óxido nítrico. Sin embargo, una respuesta dependiente de indometacina fue observada en experimentos preliminares, sugiriendo que el metabolismo del ácido araquidónico (AA) podría estar involucrado en los cambios en las respuestas vasculares observadas durante la obesidad. Por lo tanto, investigamos el impacto de la obesidad en el metabolismo del AA en la circulación coronaria. Se emplearon ratones C57/BL6 (6 semanas), y fueron alimentados con una dieta estándar (grupo control) o con una dieta alta en grasas (grupo obeso), durante 8 semanas. Se empleó el sistema Langendorff de perfusión de corazón aislado para evaluar los cambios en la presión de perfusión coronaria (PPC). Después de la administración de la dosis de AA (30 µg), la PPC fue adquirida y los perfusados fueron colectados para la posterior cuantificación de TXB2 y PGI2 por medio de ELISA en ambos grupos, control y obesos. Inmediatamente después de la perfusión, los corazones se congelaron, y las enzimas tromboxano sintasa (TXS) y ciclooxigenasa-2 (COX2) fueron medidas por medio de Western Blot. La administración de AA provocó una respuesta contráctil mayor en las arterias coronarias del grupo de ratones obesos en comparación con el grupo control. Además, la liberación de TXB2 estuvo incrementada en los perfusados del grupo obeso en comparación con el grupo control, mientras que la síntesis de PGI2 fue similar en ambos grupos. De igual manera, se encontró que las enzimas TXS y COX2 se veían expresadas mayormente en el grupo obeso en comparación al grupo control.

Estos resultados sugieren que durante la obesidad el metabolismo del AA sufre un desbalance en la producción de sustancias vaso relajantes y vaso constrictoras, incrementándose las cantidades liberadas de TXA2 con el consecuente incremento en la presión sanguínea.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por fomentar el desarrollo científico en el país, y por la beca que hizo posible estudiar esta maestría, así este proyecto.

Al Dr. Bruno Escalante, por la confianza brindada y por todo el conocimiento transmitido, porque encontré en él un ejemplo a seguir en la investigación científica. A la Q.F.B. Amelia Rios, por toda la paciencia y la ayuda proporcionada a lo largo de este periodo en el laboratorio.

A mis sinodales, los doctores Daniel Sánchez y Jesús Rodríguez, por sus acertados comentarios que reforzaron este trabajo; así como a mi compañero Alberto Peña, a quien le agradezco haberme enseñado la técnica Langendorff, que fue la columna vertebral de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Ángel Navarro Becerra y Carlos Antonio Franco Urquijo por hacer mas divertidos los días y menos pesadas las cargas.

A mi amigo Juan Carlos Pérez Martínez, que a cada instante me ha animado a seguir sin importar los tropezones y por estar siempre de forma incondicional.

A mi familia que son mi razón de ser. A mis papás, que siempre han respaldado mis decisiones, por darme siempre los mejores consejos y enseñarme a tener los pies en la tierra. A mis hermanos, que han estado en todo momento, en especial a mi hermano Jorge, que estuvo conmigo desde el inicio de este viaje.

A Suertudo, por enseñarme a disfrutar cada instante. A Barbita, porque de ella aprendí a valorar la vida y a enfrentarla pese a las dificultades, por hacerme entender que no importan las circunstancias sino como las enfrentamos. A ambos, les agradeceré siempre el haberme enseñado a querer.

Y finalmente, al M.P.D.U. Juan Enrique Díaz Aguilar, que me entregó su confianza desde el primer día y que, sin querer, me ha hecho sonreír de nuevo.

A todos quienes hacen mi mundo más bonito... ¡Gracias!





Índice general

Índice de figuras	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	11
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	15
5.1. Objetivo General	15
5.2. Objetivos Específicos	15
6. Materiales y Métodos	17
6.1. Caracterización de la respuesta vascular coronaria	17
6.1.1. Caracterización del efecto del ácido araquidónico	23
6.1.2. Demostrar qué molécula es la responsable de los cambios en la presión de perfusión coronaria	23
6.1.3. Bloqueo de la síntesis de tromboxano A2	24
6.1.4. Comprobar qué receptor se está activando tras la administración de AA	24
6.2. Tinción de arterias	25
6.3. ELISA	26
	XI

6.4. Western Blot	27
6.4.1. Homogenización y lisis del corazón	27
6.4.2. Cuantificación de proteínas	28
6.4.3. Electroforésis	29
6.4.4. Transferencia	30
6.4.5. Incubación con anticuerpos	31
6.4.6. Fotodocumentación	32
7. Resultados	33
7.1. Demostrar que la respuesta contráctil inducida por ácido araquidónico en ratones obesos se ve aumentada	36
7.2. Identificar el metabolito del ácido araquidónico responsable de la respuesta coronaria	40
7.3. Caracterizar el mecanismo responsable del cambio en el metabolismo del ácido araquidónico	41
7.3.1. Bloqueo en la síntesis de tromboxano A ₂	43
7.3.2. Cambio en el número de receptores	45
8. Discusión	47
9. Conclusión	51
10. Perspectivas	53
Bibliografía	55
A. Apéndice 1	I
A.1. Soluciones Empleadas	I
A.1.1. Krebs-Heinselt (10X)	I
A.1.2. Buffer pH 6.8	II
A.1.3. Buffer pH 7.4 (10X)	II

A.1.4. Buffer pH 8.8	II
A.1.5. Buffer de Lisis	III
A.1.6. Buffer de Carga	III
A.1.7. Gel Separador 10 %	III
A.1.8. Gel Concentrador	IV
A.1.9. Buffer de Corrida (10X)	IV
A.1.10. Buffer de Transferencia	IV
A.1.11. Buffer TBS (10X)	V
A.1.12. Buffer TBS-T	V
A.1.13. Stripping Buffer	V
A.1.14. Leche Blot	VI
A.1.15. Solución Desteñidora	VI
A.1.16. Azul de Coomasie	VI
A.1.17. Rojo de Ponceau	VII
A.2. Fármacos empleados	VIII
A.2.1. Ácido Araquidónico 20 mM	VIII
A.2.2. Acetilcolina (0.16M)	VIII
A.2.3. 1-Benzylimidazol	VIII

Índice de figuras

2.1. Estructura química del ácido araquidónico	3
2.2. Cascada de señalización del ácido araquidónico ^[9]	4
2.3. Eicosanoides resultantes del metabolismo del ácido araquidónico por medio de la enzima COX	5
2.4. Síntesis de PGI ₂ en endotelio y efecto en músculo liso	7
2.5. Capas que conforman al vaso sanguíneo	7
2.6. Síntesis de TXA ₂ en plaquetas y efecto en músculo liso	8
6.1. Esquema de corte para la remoción de piel y pelo marcado con la línea punteada	18
6.2. Exposición de tráquea para ventilación mecánica durante la cirugía	18
6.3. Ruptura y levantamiento de costillas para exposición y extracción de corazón	19
6.4. Corazón canulado y colocado en el equipo Langendorff que está siendo perfundido con la solución fisiológica de Krebs.	20
6.5. Diagrama del funcionamiento del equipo Langendorff. La solución fisiológica de Krebs, previamente aireada con la mezcla de 95 %O ₂ y 5 %CO ₂ , es fluida a una temperatura de 37°C hacia el corazón, mientras que los datos en los cambios de presión se registran mediante un equipo de cómputo.	21
6.6. Diagrama de la metodología empleada para la técnica Langendorff	22
6.7. Protocolo empleado para la administración de ácido araquidónico a los corazones montados en el equipo Langendorff	23

6.8. Protocolo para la inhibición de los metabolitos derivados del ácido araquidónico mediante la perfusión de indometacina a los corazones montados en el equipo Langendorff	24
6.9. Protocolo empleado para la perfusión del fármaco inhibidor de la enzima tromboxano sintasa.	24
6.10. Protocolo experimental empleado para la administración del fármaco U46619, agonista específico del receptor de tromboxano A2	25
6.11. Colocación de corazón en buffer de lisis (izquierda) para su posterior homogenización (derecha)	28
6.12. Electroforesis en marcha, se puede observar la separación, de acuerdo a su peso molecular, de las proteínas correspondientes al marcador de peso molecular empleado	30
6.13. (A) Gel resultante de la electroforesis teñido con azul de Coomassie, se observan las bandas azules correspondientes a la proteína de la muestra. B) Gel teñido con azul de Coomassie posterior a la transferencia de proteínas a la membrana. C) Membrana de PVDF con las proteínas transferidas y teñida con colorante rojo de Ponceau que permite visualizar las proteínas mediante la tonalidad roja	31
6.14. Imagen de la membrana de PVDF revelada mediante quimioluminiscencia, en donde las bandas negras indican las proteínas con las que reaccionaron los anticuerpos	32
7.1. Peso promedio de los ratones C57BL6 empleados en el experimento, el grupo control mostrado en rojo y el grupo obeso en azul.	33
7.2. Cortes correspondientes a arterias aorta de los grupos control (A) y obeso (B), en donde una mayor coloración roja indica mayor presencia de grasas	34
7.3. Contenido de grasa en las arterias aorta de los grupos control y obesos, medida en relación a la intensidad de color rojo mostrada en unidades arbitrarias (U.A.)	34

7.4.	Cortes correspondientes a arterias coronarias de los grupos control (A) y obeso (B), en donde una mayor coloración roja indica mayor presencia de grasas, el cual se observa tanto en el tejido cardiaco como en el tejido arterial. En los recuadros de ambas figuras se observa un zoom a las paredes arteriales mostrando mayor contenido de grasas en el grupo obeso.	35
7.5.	Contenido de grasa representado por la intensidad de color rojo mostrada en unidades arbitrarias (U.A.) en las arterias coronarias de ambos grupos analizados	35
7.6.	Trazo representativo del incremento en la PPC en corazones del grupo control tras la administración de una dosis de AA.	36
7.7.	Trazo representativo del incremento en la presión de perfusión coronaria en corazones provenientes de animales del grupo obeso tras la administración de la dosis de AA	37
7.8.	Incremento en la presión de perfusión coronaria. Se observa que el grupo obeso presenta un mayor incremento en la PPC tras la administración de la dosis de ácido araquidónico, en comparación al grupo control en el mismo periodo de tiempo. $p < 0.05$	38
7.9.	Tras la administración de la dosis de AA al grupo control (rojo) se registró un incremento en la presión de perfusión coronaria, la cual se vio bloqueado mediante la perfusión del fármaco indometacina (verde). Mientras que para el grupo obeso (azul) que también registraba un incremento en la presión de perfusión, cuando se le perfundió con indometacina de igual manera la respuesta se vio inhibida (púrpura).	39
7.10.	Medición de PGI ₂ en perfusados previos (Basal) y posteriores a la estimulación con ácido araquidónico (AA). En estado basal la cantidad de PGI ₂ era mayor en el grupo control en comparación al grupo obeso, sin existir diferencia significativa ($p < 0.05$). Tras la administración de ácido araquidónico la diferencia entre ambos grupos siguió siendo no significativa.	40

7.11. La liberación de TXB2 en condiciones basales fue muy similar en ambos grupos. Sin embargo tras la administración de AA el grupo obeso (azul) presentó un incremento notable en las cantidades producidas de TXB2 en comparación al grupo control (rojo). * $p < 0.05$	41
7.12. Medición de la enzima COX2 por medio de Western Blot. Se observa una mayor expresión de la enzima en el grupo obeso en relación al grupo control (A), esto a partir del análisis de imágenes de las bandas obtenidas por Western Blot (B). $p < 0.05$	42
7.13. Medición de TXS mediante Western Blot. Tras la medición de la enzima tromboxano sintasa por medio de Western Blot se encontró que esta se ve mayormente expresada en periodos de obesidad (azul) en comparación al grupo control (rojo). La Figura 7.13 B muestra una imagen representativa de los blots empleados para la obtención de estos datos. $p < 0.05$	43
7.14. Perfusión de 1-Benzylimidazol. Se muestra el bloqueo de la respuesta a la administración de AA, inhibiendo la enzima tromboxano sintasa y la formación del metabolito tromboxano	44
7.15. Mediante el empleo del fármaco 1-Benzylimidazol (gris) se bloqueó la formación de tromboxano, impidiendo así una contracción en los corazones de ambos grupos, en comparación a una perfusión normal (Lila) en donde la contracción era mayor en el grupo obeso.	44
7.16. Trazos representativos del efecto producido tras la administración de U46619 (flecha) a corazones control (rojo) y obesos (azul), siendo este último grupo el que mostró un mayor incremento en la presión de perfusión coronaria.	45
7.17. El empleo del fármaco agonista selectivo del receptor de tromboxano A2, U46619, mostró que el grupo obeso ve incrementada en aproximadamente tres veces mas la respuesta al AA en comparación al grupo control, siendo esta diferencia significativa a un nivel de 0.05 de confianza.	46

1

Introducción

La obesidad es una enfermedad mundial que se acompaña por diversas enfermedades metabólicas tales como hipertensión, hiperglicemia y dislipidemia^[1]. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2014 más de 1.9 billones de adultos, mayores de 18 años presentaban sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones presentaban obesidad^[2]. Por estas razones, la obesidad es considerada un factor de alto riesgo, asociada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares entre las cuales la enfermedad de las arterias coronarias (EAC), que fue la principal causa de muerte en el año 2012^[2]; y que se caracteriza por cambios tempranos en las funciones endoteliales^[3].

Las células endoteliales forman la capa interna de los vasos venosos y arteriales, y bajo condiciones normales, estas células producen constantemente sustancias vasoactivas que se encargan de controlar mecanismos vasculares tales como la inflamación, la vasoconstricción y la vasodilatación. Dichas sustancias vasoactivas son derivadas del ácido araquidónico (AA), un ácido graso poliinsaturado que forma parte de los fosfolípidos de la membrana plasmática y que mediante la acción hidrolítica de la enzima fosfolipasa A2 (PLA2)^[4] es metabolizado. Las diversas acciones celulares ejercidas por el ácido araquidónico son iniciadas posteriormente a su liberación de la membrana celular y por su subsecuente conversión a una familia de metabolitos biológicamente activos, conocidos con el nombre de eicosanoides^[5], resultantes de la acción de tres diferentes enzimas: LOX, CYP450 y COX. En este trabajo, son de particular importancia los eicosanoides producidos por la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX) sobre el AA, que a su vez son conocidos como prostanoide^[6]; las funciones vasculares de los prostanoide están asociadas con el mantenimiento del tono vascular de tal manera que el

1. Introducción

AA produce prostaglandinas con actividad vasoconstrictora, tal como la prostaglandina E2^[7], F2^[8] y el tromboxano A2 (TxA2)^[6]; y también produce prostaglandinas vasodilatadoras, como lo son las prostaglandinas D2 y la prostaciclina I2 (PGI2)^[9]; pero son el tromboxano A2 y la prostaciclina I2, principalmente, quienes se encargan de mantener la homeostasis vascular en las arterias coronarias ^[6,8], actuando como polos opuestos en el mecanismo de la regulación vascular^[10] mediante la generación de vasoconstricción y vasodilatación, respectivamente.

2

Antecedentes

El aislamiento del ácido araquidónico por primera vez se remonta al año 1907, cuando se aisló a partir de lípidos provenientes del hígado.^[11]

El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado ω -6, y está formado por una cadena de 20 carbonos con cuatro dobles enlaces en su estructura, que se encuentran en las posiciones 5, 8, 11 y 14, (Figura 2.1) y es uno de los principales componentes de la membrana fosfolipídica de la célula^[12].

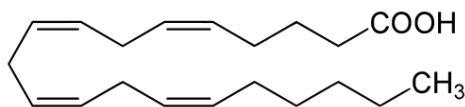


Figura 2.1: Estructura química del ácido araquidónico

El ácido araquidónico, como ya se mencionó, es almacenado en la membrana celular y es liberado por medio de la hidrólisis de estos a través de las enzimas fosfolipasa A (PLA2) o fosfolipasa C (PLC)^[9]. A su vez, el ácido araquidónico libre es transformado por las enzimas Lipooxigenasa (LOX)^[13], citocromo P450 (CYP450)^[14] o bien mediante la enzima ciclooxigenasa (COX). Estas vías de oxidación conducen a la formación de los llamados eicosanoides, que se encuentran involucrados en la señalización celular a través de actividades tanto intracelulares como extracelulares en un proceso conocido como cascada de señalización del ácido araquidónico^[15] (Figura 2.2), por lo que este ácido juega un papel importante en el rol de regulación de todo tipo de células.

Aunque los efectos del AA generalmente dependen de los productos previamente mencionados, el ácido araquidónico pareciera poseer su propia actividad biológica, tal como ejercer efectos proliferativos sobre las células endoteliales del tejido aórtico

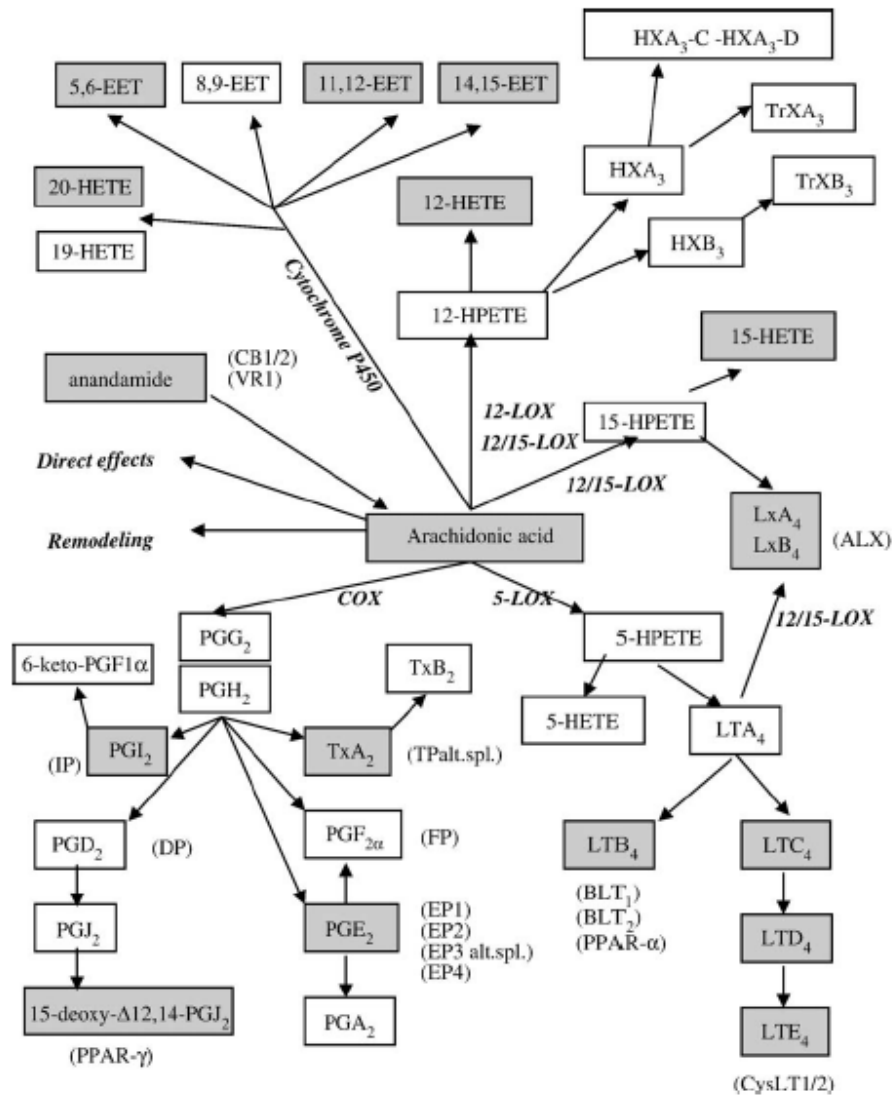


Figura 2.2: Cascada de señalización del ácido araquidónico [9]

bovino^[16].

Los metabolitos lipooxygenados del AA parecen jugar un papel muy importante en el desarrollo de la inflamación, aunque también se les ha ligado en el remodelado vascular. Para dar lugar a los productos lipooxygenados del AA es necesaria la enzima lipooxygenasa, la cual tiene 4 diferentes isoformas: 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX y 15-LOX; y de la acción de estas enzimas surgen los leucotrienos, lipoxinas y algunas de las varias isoformas del ácido hidróxicoisatetraenoico (HETEs). Mientras que, por medio de

la monooxigenación del CYP450 se sintetizan isoformas del ácido epóxicoisatrienoico (EETs) y algunas más del ácido hidróxicoisatetraenoico (HETEs). Por último, del metabolismo del ácido araquidónico por medio de la enzima COX resultan las prostaglandinas G₂ (PGG₂) y H₂ (PGH₂); a partir de aquí todo dependerá de las enzimas sintasa para la conversión de estas prostaglandinas a prostaglandina D₂ por medio de la sintasa D₂ (PGDS), a PGE₂ a través de la acción de la sintasa PGES, prostaglandina F₂ por medio de PGFS, prostaciclina (PGI₂) por medio de la enzima PGI sintasa (PGIS), y por parte de la tromboxano sintasa (TXS) se produce tromboxano (TXA₂). El tipo de enzima presente dependerá a su vez del tejido en el que se esté llevando a cabo la metabolización del ácido araquidónico (Figura 2.3)

Eicosanoide	Sitio de síntesis	Actividad Biológica
PGD ₂	Mastocitos, eosinófilos, cerebro	<ul style="list-style-type: none"> • Induce respuesta inflamatoria • broncoconstricción • involucrado en alopecia
PGE ₂	Riñón, bazo, corazón	<ul style="list-style-type: none"> • Broncoconstricción (EP1) • Tracto gastrointestinal: contracción del músculo liso (EP1) • Broncodilatador(EP2) • Tracto gastrointestinal: relaja el músculo liso (EP2) • Vasodilatación (EP2) • ↓ Secreción ácida del estómago (EP3) • ↑ Secreción mucosa del estómago (EP3) • En embarazadas: contracción uterina, dilatación y borramiento cervical (EP3) • Contracción del músculo liso del estómago (EP3) • Inhibe la lipólisis (EP3)
PGF ₂ α	Riñón, bazo	<ul style="list-style-type: none"> • Contracción uterina • Broncoconstricción • Contracción de musculo liso
PGI ₂	Corazón, células vasculares endoteliales	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe agregación plaquetaria • Induce vasodilatación • Induce la producción de cAMP
TXA ₂	Plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> • Induce agregación plaquetaria • Vasoconstricción • Broncoconstricción

Figura 2.3: Eicosanoides resultantes del metabolismo del ácido araquidónico por medio de la enzima COX

Como se observa en la (Figura 2.3), son varios los metabolitos derivados generados por la acción de la enzima COX, sin embargo, ha sido reportado que son la prostaciclina (PGI₂) y el tromboxano A₂ (TXA₂) los metabolitos encargados de la regulación vascular, actuando como polos opuestos^[11] para cumplir con las necesidades de suministro sanguíneo a los diversos órganos. Estos dos metabolitos, PGI₂ y TXA₂, son bastante inestables, y se degradan de manera rápida (aproximadamente 30 segundos) a 6-keto prostaglandin F_{1α} y tromboxano B₂, respectivamente, después de cumplir con su función biológica.

El término ciclooxigenasa (COX) fue puesto en uso para describir a la enzima que haría posible la oxigenación del ácido araquidónico, y su rol en esto fue confirmado mediante el aislamiento de los prostanoideos en 1973^[17,18]. La enzima COX es un blanco de importancia farmacológica, ya que por medio del uso de fármacos no esteroideos se logra inhibir la formación de prostanoideos^[19]. Existen dos isoformas de la enzima COX (COX-1 y COX-2) que son de tamaño similar (alrededor de 71 kDa), y presentan similar especificidad de sustrato así como cinética enzimática, pero varían en su expresión y distribución^[20,21]. Mientras que COX-1 se encuentra expresada de manera uniforme en todas las células y es responsable de las funciones normales de las células, incluido el funcionamiento normal de los prostanoideos, la enzima COX-2 no es expresada de manera constitutiva en ningún tejido a excepción del cerebro^[22-24], y es inducible en respuesta a diversos estímulos^[25].

Dependiendo del tipo de tejido en donde la enzima COX haya llevado a cabo su función será el prostanoides producido, por ejemplo, si esto ocurre en el endotelio, se dará la formación de PGI₂.

El endotelio fue considerado alguna vez como una simple barrera entre la sangre y la pared vascular, sin embargo, hoy en día se le considera como un órgano dinámico que recubre todo el sistema vascular^[26], además de ser el principal productor de PGI₂ (Figura 2.4)

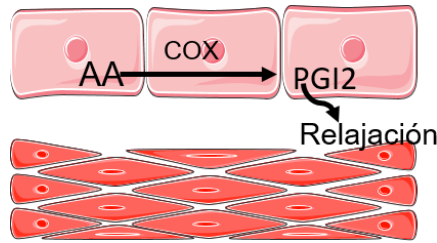


Figura 2.4: Síntesis de PGI₂ en endotelio y efecto en músculo liso

Las células endoteliales se localizan en la capa íntima de todos los vasos sanguíneos, que es el revestimiento interior y controla la función vascular respondiendo a diversos estímulos. (Figura 2.5)

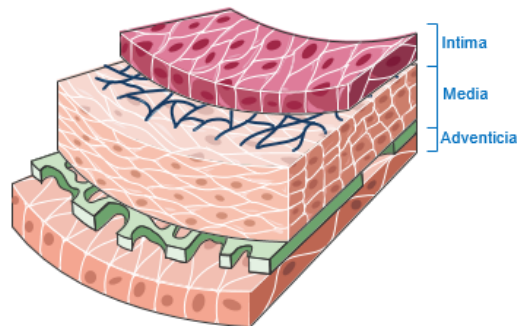


Figura 2.5: Capas que conforman al vaso sanguíneo

Desde hace varios años de estudio, se sabe que el endotelio es un órgano con importancia endocrina, autocrina y paracrina, y tiene diferentes funciones, entre las cuales se encuentra incluida la vaso regulación, crecimiento de vasos sanguíneos, inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de trombosis^[27–30]. La vaso regulación ocurre como resultado del balance entre factores relajantes y factores de contracción derivados del endotelio. La enzima que sintetiza TXA₂ a partir de PGH₂ se localizó por

primera vez en una fracción de las plaquetas de humanos y de caballos^[31–33]. Aunque hasta el momento está reportado que el ácido araquidónico se metaboliza predominantemente en las plaquetas por medio de la vía de la lipooxigenasa^[34–36], la participación de la ruta metabólica por medio de la enzima COX es de vital importancia para la regulación vascular^[37–39], mediante la producción del metabolito tromboxano A₂ (Figura 2.6), que se encarga de la vasoconstricción. La enzima TXS es una enzima inducible y bifuncional, ya que se le ha reportado como catalizadora también del ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico (HHT)

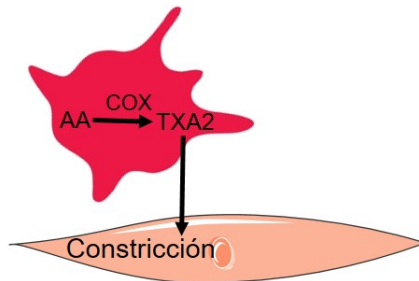


Figura 2.6: Síntesis de TXA₂ en plaquetas y efecto en músculo liso

Para el funcionamiento óptimo de las células es necesaria una constante producción de los metabolitos provenientes del AA, limitar el consumo de ácido araquidónico podría tener repercusiones en la salud, sin embargo, también ha sido sugerido que consumir mucho ácido araquidónico podría acarrear problemas tales como enfermedades del corazón o inflamación^[40–42], pero hasta este momento aún no se tiene claro el papel que juega el AA en estas patologías.

Así mismo, desde su descubrimiento el AA ha sido estudiado por su intervención en otras enfermedades tales como la respuesta endocrina al estrés, la resistencia a la insulina, cáncer y en la EAC^[11]. Por otro lado, se ha relacionado también las cantidades de AA presentes en el tejido adiposo con el riesgo de padecer EAC, pero los resultados no han sido concluyentes^[43–45], tomando en cuenta que el grado de obesidad de los participantes en estos estudios fue muy variable; sin embargo, lo que sí ha sido correlacionado es la cantidad de AA con las cantidades presentes de colesterol^[46]. De la misma

manera, se ha relacionado al AA como promotor de células grasas^[47], principalmente se ha implicado a PGI₂ en la adipogénesis, aunque paradójicamente también se ha implicado a TXA₂ como factor determinante en el desarrollo de células grasas^[48]. Por lo que podemos decir que tanto el AA *per sé*, así como sus metabolitos, provenientes del metabolismo por COX, son fundamentales en la adipogénesis, y por ende en el desarrollo de enfermedades ligadas a la obesidad, tales como la EAC y la hipertensión arterial, sin embargo, el mecanismo por el cual un incremento en el tejido graso genera estos padecimientos aún es desconocido^[49].

Por otra parte, los metabolitos producidos por el AA son también protagonistas en ciertas patologías, ya que diversos tipos de células son blanco de acción de estos metabolitos, sin embargo, existen tejidos que están íntimamente ligados a la acción de estos. Por ejemplo, un desbalance en prostanoídes ha sido ligado al desarrollo de inflamación^[50], así como una disminución en la angiogénesis^[51], se ha demostrado que los receptores de tromboxano y prostaciclina controlan estrechamente la proliferación vascular inducida por lesiones; los ratones deficientes del receptor de tromboxano han mostrado una tasa de proliferación de la capa íntima suprimida, mientras que los ratones deficientes en receptores de prostaglandina I₂ tienen una proliferación de la capa íntima mejorada. Al mismo tiempo, la ruptura de células endoteliales da como resultado una mayor producción de prostaglandinas I₂ y E₂, por lo tanto, se puede decir que las prostaglandinas regulan el estado de las células endoteliales y, a la inversa, los reordenamientos de estas células alteran la producción de las cantidades de prostaciclina^[52].

De la misma manera que los productos del AA por medio de la enzima COX se ven envueltos en ciertas patologías, los metabolitos provenientes del metabolismo por LOX se involucran en procesos asmáticos y de reacciones alérgicas, así como también se ven involucrados en parte en el desarrollo de inflamación y edema^[53–55]. Al igual que algunos derivados de COX, las lipoxinas, han probado ser mediadores angiogénicos en el endotelio bajo ciertas condiciones, además de estimular la producción de PGI₂ en este tejido^[56]. Mientras que, los derivados de CYP450, EETs, causan la hiperpolarización en la membrana endotelial y de músculo liso, y por lo tanto llegan a ser llamados como

factores hiperpolarizantes derivados del endotelio.

El aumento de la liberación de AA y la conversión a metabolitos bioactivos son una respuesta a los trastornos del tejido mediante varios estímulos. La mayoría de las células participan en tales respuestas, actuando como una fuente y una diana para los metabolitos del AA. La acción multidireccional, y en ocasiones opositora de las prostaglandinas, a menudo puede llegar a ser un poco confusa, por lo que una mejor comprensión de estos mecanismos puede proporcionar oportunidades para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas.

3

Justificación

Los trabajos anteriores de nuestro grupo^[57] sugieren que durante la obesidad, la sensibilidad vasoconstrictora coronaria se ve aumentada, lo que se asocia con una mayor cantidad de infartos en personas obesas. El mecanismo responsable parece ser la pérdida del balance entre la dilatación y la constricción en las arterias coronarias, causado por la reducción en metabolitos vasodilatadores, tales como el óxido nítrico y la PGI₂ o bien, debido a un incremento en los metabolitos vasoconstrictores, como el tromboxano A₂.

3. Justificación

4

Hipótesis

Durante la obesidad cambios en el metabolismo del ácido araquidónico modifica la respuesta vascular coronaria favoreciendo la síntesis de prostaglandinas vasoconstrictoras que reducen el flujo hacia el tejido cardiaco a través de la circulación coronaria y/o a la pérdida de prostaglandinas vasodilatadoras.

5

Objetivos

5.1. Objetivo General

Demostrar que el aumento en la respuesta vasoconstrictora coronaria en ratones obesos está asociada a los cambios en el metabolismo del ácido araquidónico, favoreciendo la síntesis de prostaglandinas vasoconstrictoras.

5.2. Objetivos Específicos

1. Demostrar que la respuesta contráctil inducida por ácido araquidónico en ratones obesos se ve aumentada
2. Identificar el metabolito del ácido araquidónico responsable de la respuesta coronaria
3. Caracterizar el mecanismo responsable del cambio en el metabolismo del ácido araquidónico
 - Caracterizar el cambio de las proteínas responsables de la síntesis de TXA2 en el tejido cardiaco de ratones normales y obesos
 - Caracterizar la respuesta de los receptores de TXA2 en la circulación coronaria de ratones normales y obesos.

6

Materiales y Métodos

Se emplearon ratones macho de la cepa C57/BL6 de una edad inicial aproximada de 8 semanas, que se obtuvieron del bioterio central del CINVESTAV-IPN, México, los cuales se dividieron en dos grupos: grupo control (GC) y grupo obeso (GO). El grupo control fue alimentado con una dieta estándar (18% de contenido de grasas totales), mientras que al grupo obeso se le alimentó con una dieta alta en grasas (58% de contenido de grasas totales).

6.1. Caracterización de la respuesta vascular coronaria

Los protocolos empleados en este trabajo fueron aprobados por el comité de ética del Comité Interno para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV.

1. Para cada experimento, se procedió a pesar el ratón empleado y dependiendo del peso registrado se aplicó una dosis de anestesia (ketamina, xylasina y solución salina, 2:1:1) en una dosis correspondiente a 100 μ l por cada 50 g de peso, así mismo se aplicó una dosis de 0.1 ml de heparina para evitar la formación de coágulos durante el procedimiento. Ambas administraciones se hicieron de forma intraperitoneal.
2. Con la certeza de que el ratón se encontraba profundamente anestesiado, se procedió a la remoción de pelo y piel que recubre la cavidad torácica, en forma de “T” invertida (Figura 6.1), para dejar visibles las glándulas salivares del ratón, mismas que se separan para exponer la tráquea.

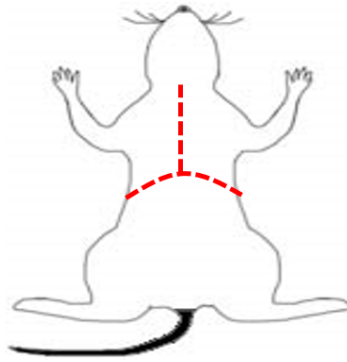


Figura 6.1: Esquema de corte para la remoción de piel y pelo marcado con la línea punteada

3. Con la tráquea visible, tal como se muestra en la Figura 6.2, se procedió a pasar un hilo de nylon por debajo de la misma, y a hacer un pequeño orificio en ella para poder ventilar al ratón de manera artificial mediante una cánula de calibre 21G, y sujetándola por medio del hilo, previamente colocado, conectada a un ventilador (Ugo Basile 28025) con un flujo de 0.8 ml y una frecuencia de 110 insuflaciones por minuto.

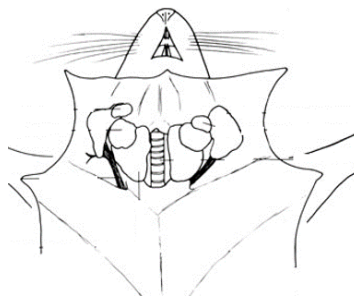


Figura 6.2: Exposición de tráquea para ventilación mecánica durante la cirugía

4. Se procedió a hacer una incisión horizontal en el abdomen, dejando expuestos los órganos internos del animal y el diafragma.
5. Se realizaron dos pequeños cortes a los laterales del costillar, rompiendo de esta manera el diafragma, que se cortó de manera horizontal permitiendo ver los pulmones y corazón.
6. Se rompieron las costillas de manera lateral y levantaron sobre el rostro del animal a manera de tapa y se sujetaron con fórceps permitiendo tener completamente

expuestos a los pulmones y al corazón. (Figura 6.3)

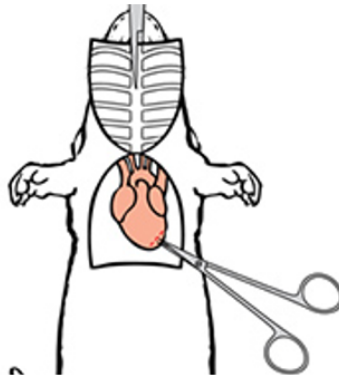


Figura 6.3: Ruptura y levantamiento de costillas para exposición y extracción de corazón

7. Se procedió a la localización visual de la aorta mediante la ayuda de un microscopio estereoscópico, y se pasó un hilo por debajo de ella, con el cual se hizo un nudo suelto. Estando perfectamente identificada la aorta se procede a hacer el corte de la misma por encima del nudo y ayudándose del hilo colocado se fueron haciendo los cortes necesarios para que el corazón quedara libre y se removiera del ratón
8. El corazón se limpió en solución Krebs (118 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 1.2 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mM de NaHCO_3 , 11.7 mM de dextrosa y calcio) y se procedió a hacer la canulación de la aorta en una cánula de calibre 20G a la cual se fijó por medio de un hilo de nylon haciendo un nudo lo suficientemente fuerte para sostener el corazón, cuidando en todo momento de que la cánula no perforara la válvula aórtica ni obstruyera las arterias coronarias.
9. Se hizo fluir solución de Krebs al corazón ya canulado, verificando que las arterias coronarias se limpiaran por completo; de no haber canulado de manera correcta dichas arterias no se limpian, también se verifica que el nudo no haya quedado suelto y genere fugas de la solución.
10. El corazón canulado se montó en el equipo Langendorff (Figura 6.4) y se dejó fluir solución de Krebs aireada con una mezcla de carbógeno (95 % O_2 y 5 % CO_2) a

una temperatura constante de 37°C

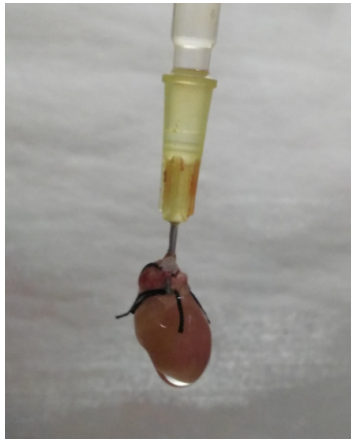


Figura 6.4: Corazón canulado y colocado en el equipo Langendorff que está siendo perfundido con la solución fisiológica de Krebs.

11. Se esperó que el corazón se estabilizara a las nuevas condiciones durante un tiempo aproximado de 20 minutos. Estando estable se procedió a administrar 30 μg de ácido araquidónico para registrar la respuesta causada por este. Este mismo procedimiento se realizó con ratones control y con ratones obesos.
12. Una vez terminadas las pruebas los corazones se recolectaron y almacenaron a -80°C.

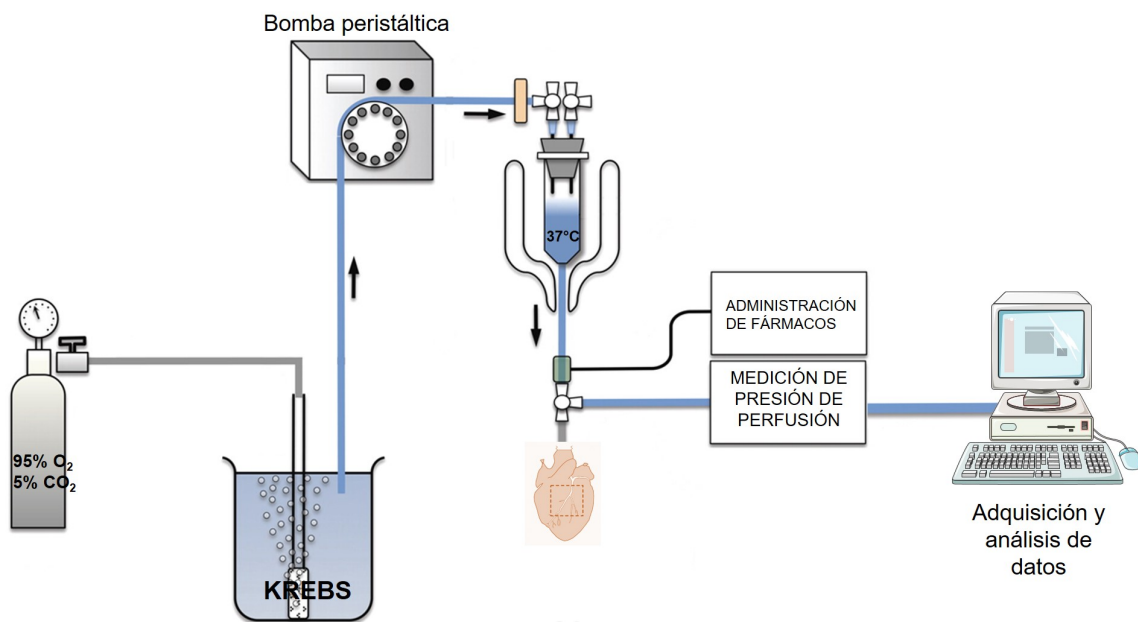


Figura 6.5: Diagrama del funcionamiento del equipo Langendorff. La solución fisiológica de Krebs, previamente aireada con la mezcla de 95 %O₂ y 5 %CO₂, es fluida a una temperatura de 37°C hacia el corazón, mientras que los datos en los cambios de presión se registran mediante un equipo de cómputo.

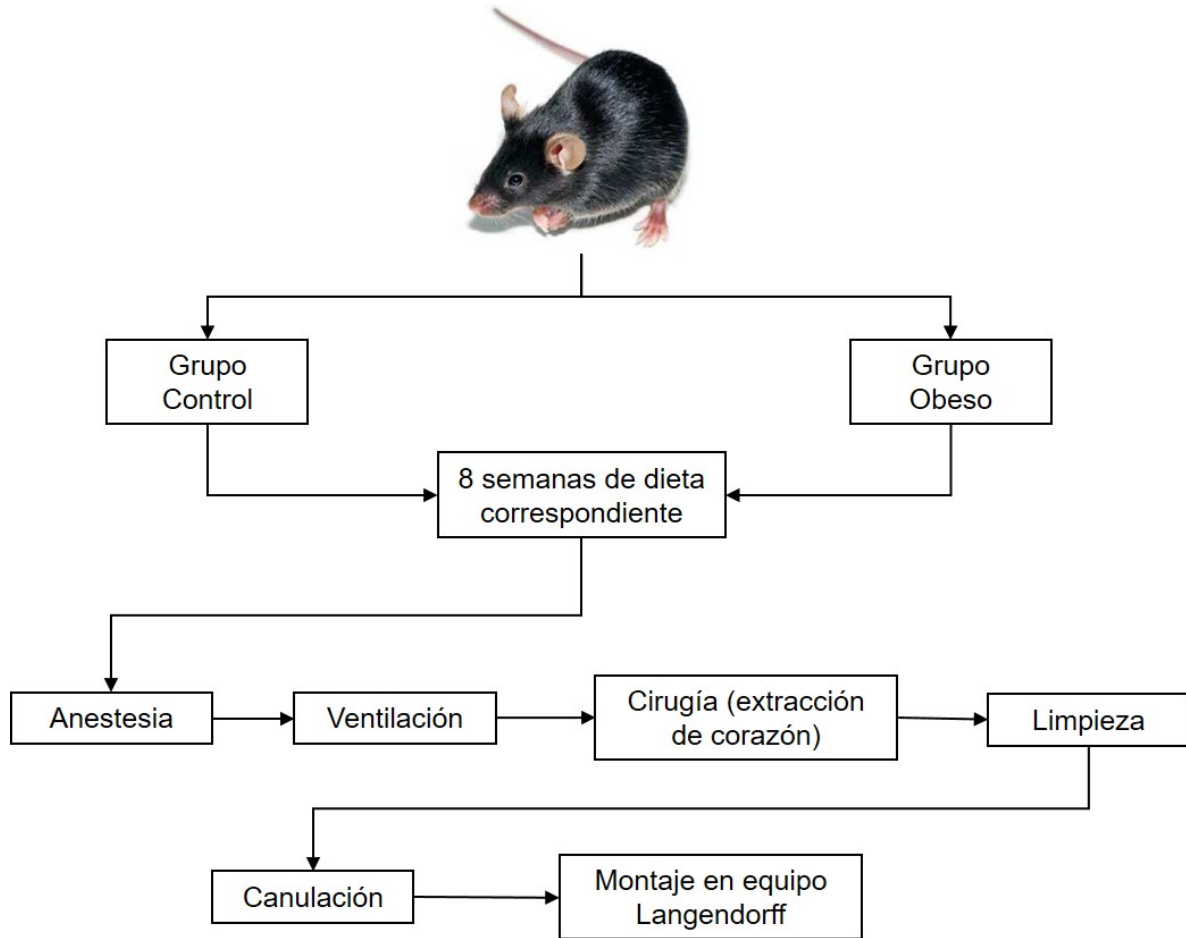


Figura 6.6: Diagrama de la metodología empleada para la técnica Langendorff

Se emplearon diferentes protocolos para esta técnica, y fueron los siguientes:

6.1.1. Caracterización del efecto del ácido araquidónico

Una vez montado el corazón en el equipo Langendorff se le dio un periodo de 20 minutos para aclimatarse a las nuevas condiciones, y una vez estable, se le administró un volumen de $10\ \mu\text{l}$ de Ach a una concentración de $0.16\ \text{M}$ para determinar si el corazón era viable. De serlo se le dio un segundo periodo de estabilización para permitir que el fármaco Ach fuera limpiado y se procedió a administrar el volumen de $5\ \mu\text{l}$ de AA a una concentración de $20\ \text{mM}$ y registrar la respuesta mostrada.

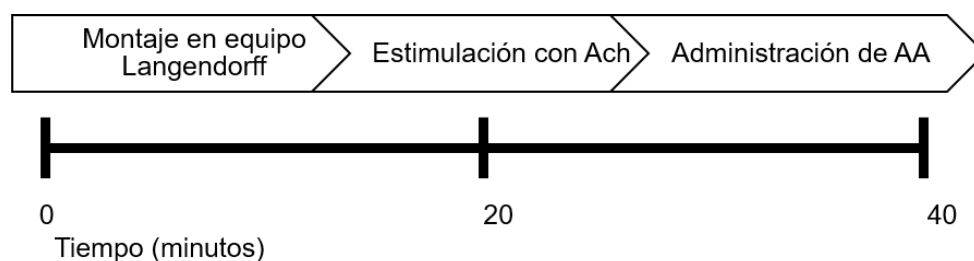


Figura 6.7: Protocolo empleado para la administración de ácido araquidónico a los corazones montados en el equipo Langendorff

6.1.2. Demostrar qué molécula es la responsable de los cambios en la presión de perfusión coronaria

El corazón ya estable colocado en el equipo de Langendorff fue estimulado con un volumen de $10\ \mu\text{l}$ de Ach a una concentración de $0.16\ \text{M}$ para determinar si el corazón era viable, si lo era se comenzaba a perfundir el corazón con una solución de Krebs en la que se adicionaba el fármaco indometacina a una concentración de $3\ \text{mM}$; pasados 40 minutos de iniciada la perfusión con esta mezcla se procedió a administrar el volumen de $5\ \mu\text{l}$ de AA a una concentración de $20\ \text{mM}$ y registrar la respuesta mostrada.

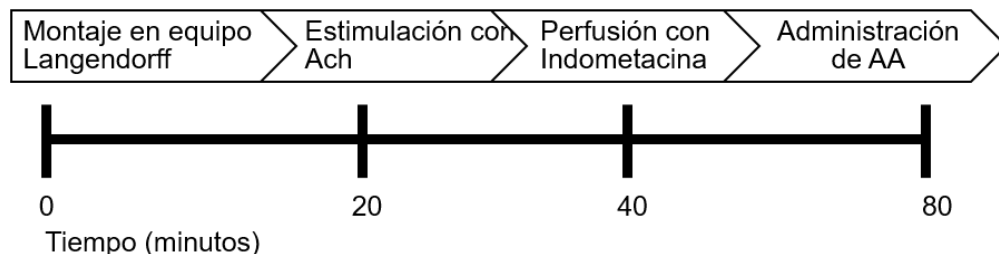


Figura 6.8: Protocolo para la inhibición de los metabolitos derivados del ácido araquidónico mediante la perfusión de indometacina a los corazones montados en el equipo Langendorff

6.1.3. Bloqueo de la síntesis de tromboxano A₂

El corazón colocado en el equipo de Langendorff y estable fue estimulado con un volumen de 10 μ l de Ach a una concentración de 0.16 M para determinar si el corazón era viable, de serlo se comenzaba a perfundir el corazón con una solución de Krebs a la que se adicionaba el fármaco 1-Benzylimidazol, el cual bloquea a la enzima tromboxano sintasa y por lo tanto la formación de TXA₂, a una concentración de 6.4 mM; pasados 40 minutos de iniciada la perfusión con esta mezcla se procedió a administrar el volumen de 5 μ l de AA a una concentración de 20 mM y registrar la respuesta mostrada.

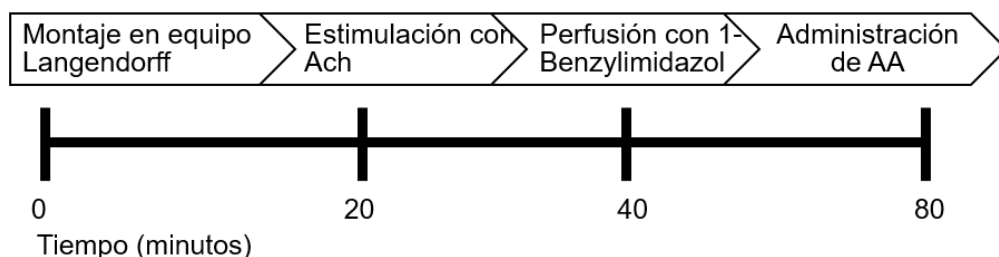


Figura 6.9: Protocolo empleado para la perfusión del fármaco inhibidor de la enzima tromboxano sintasa.

6.1.4. Comprobar qué receptor se está activando tras la administración de AA

Para determinar que receptores se estaban activando tras administrar la dosis de ácido araquidónico, se empleó un fármaco agonista del receptor (TP) de tromboxano

A2, U46619, del cual se administraron $0.7 \mu\text{g}$, una vez que el corazón montado en el equipo Langendorff fue probado con Ach y se le dio el tiempo necesario para que este último se limpiara del corazón y el efecto del U46619 fuera evidente.

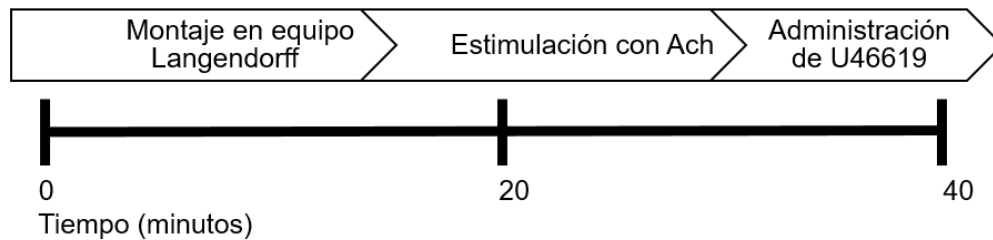


Figura 6.10: Protocolo experimental empleado para la administración del fármaco U46619, agonista específico del receptor de tromboxano A2

6.2. Tinción de arterias

Para la determinación de la cantidad de grasa presente en las arterias aorta y coronarias, se empleó el aceite rojo O (ORO, por sus siglas en inglés), y el protocolo empleado fue el siguiente:

1. Los corazones se extrajeron y limpiaron en solución de Krebs, para ser colocados en Tissue Tek rápidamente y almacenarlos a una temperatura de -80°C , al igual que se hizo con las arterias aorta.
2. El tejido en Tissue Tek se colocó en las platinas del criostato, y se comenzaron a hacer cortes del mismo de $12 \mu\text{m}$. Los cortes se colocaron en porta objetos. Cada uno de los cortes se obtenían de profundidades diferentes para que los resultados fueran representativos.
3. Una vez listos los cortes y fijados en los portaobjetos, estos se teñían con aceite rojo O, se le colocaban unas gotas del mismo al porta objetos con las muestras por un tiempo de 5 minutos
4. Terminado el tiempo de reposo con el colorante, se lavaron los portaobjetos por un periodo de 30 minutos para poder retirar el exceso de colorante

5. Las portaobjetos fueron montados con el cubreobjetos, empleando PBS como medio de montaje.
6. Se procedió a adquirir las imágenes del tejido por medio de un microscopio de luz
7. Las imágenes adquiridas fueron analizadas por medio del software ImageJ

6.3. ELISA

Para la determinación de prostaglandinas liberadas durante la estimulación con ácido araquidónico al tejido cardiaco se emplearon kits de la marca abcam, empleando el kit ab133032 para la medición de PGI₂, mientras que para la determinación de TXB₂ se utilizó el kit ab133022.

1. En el momento en el que se administró la dosis de los 0.1 μ g de ácido araquidónico al corazón analizado, se hizo la recolección de los perfusados resultantes hasta que la contracción finalizara.
2. Terminada la recolección del perfusado se procedió a guardarlo de manera inmediata a -80°C.
3. Los perfusados almacenados se sacaron de congelación hasta el momento en el que se fuera a llevar a cabo la medición de las prostaglandinas.
4. Para la realización de los ELISAs se siguió el protocolo indicado por cada kit.
5. Primeramente, se tuvo que hacer una curva estándar para la medición de TXB₂ y PGI₂, se necesitó hacer una curva estándar para cada metabolito.
6. Como medida de precaución y para no errar, se tomó una de las muestras y se hicieron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 para tener una idea de cuál de las diluciones es la correcta y caía en el mejor rango de las curvas estándar para la determinación de las prostaglandinas.
7. Dependiendo de la lectura de las diluciones anteriores se procedió a hacer las diluciones de cada muestra, en este caso fue de 1:50 de todas las muestras y se prosiguió con el resto de las instrucciones del kit
8. Pasado el tiempo de incubación mencionado por el kit se hicieron las lecturas

para la determinación de la cantidad de metabolitos presentes en las muestras mediante la curva estándar previamente realizada.

9. Dependiendo del valor que la curva estándar mostró, este se multiplicó por el factor de dilución, 50, para conocer la concentración real del metabolito en la muestra analizada.

6.4. Western Blot

Para la determinar si existían cambios en las proteínas involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico se empleó la técnica Western Blot, la cual se divide en seis pasos, y se explican brevemente a continuación:

6.4.1. Homogenización y lisis del corazón

1. El corazón almacenado a -80°C se sacó y colocó en un recipiente con hielo.
2. Se preparó la solución de lisis de acuerdo al peso del corazón; por cada 200 mg de peso de corazón se tienen que colocar 800 μl de solución de lisis, que se preparó mezclando 920 μl de buffer de lisis con 80 μl de Complete.
3. Se colocó el volumen necesario de solución de lisis en un homogenizador y se procedió a iniciar la homogenización hasta que el corazón estuviera completamente macerado y no hubieran restos de tejido visible. (Figura 6.11)
4. Se colocó el homogenado en tubos para centrifugar a 4°C durante 20 minutos a 12 rpm.
5. Terminada la centrifugación se procedió a recuperar el sobrenadante y colocarlo en tubos nuevos. Lo recuperado se empleó como muestra de proteínas, de ser necesario este sobrenadante se alicuotaba.
6. Las alícuotas se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso.

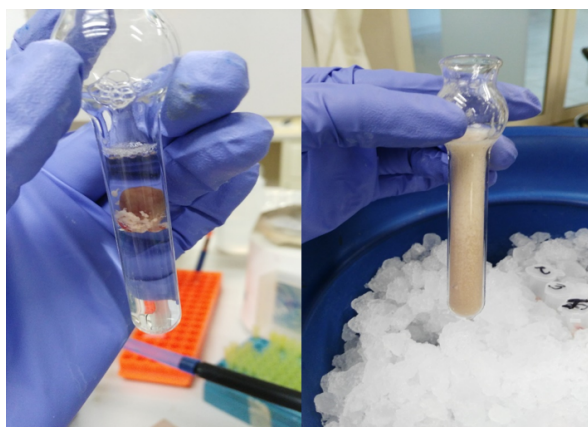


Figura 6.11: Colocación de corazón en buffer de lisis (izquierda) para su posterior homogenización (derecha)

6.4.2. Cuantificación de proteínas

1. Se preparó una curva estándar para la medición de proteínas conforme al procedimiento marcado por el kit Pierce BCA protein assay, y una vez lista la curva estándar se procedió a analizar nuestras muestras problema.
2. Se prepararon diluciones de las muestras problema, 1:10, 1:100, 1:1000. Para hacer las diluciones se empleó agua destilada.
3. Se procedió a preparar el reactivo del kit BCA “working reagent” conforme a las instrucciones, colocando 50 partes del reactivo A y una parte del reactivo B
4. En una placa de 96 pozos se colocaron 25 μl de cada una de las muestras por duplicado, así como 25 μl de agua destilada que nos sirvieron como blanco.
5. Terminando de colocar todas las muestras se procedió a colocar 200 μl de working reagent en cada pozo y se mezcló el contenido de cada pozo mediante la realización de tres pipeteos.
6. Se selló la placa e incubó a 37°C por 30 min
7. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura a 570 nm y se determinó la cantidad de proteína presente en cada muestra mediante la multiplicación por el factor de dilución empleado.

6.4.3. Electroforésis

1. Una vez conocida la concentración de proteína en cada una de las muestras se tomó la decisión de cuanto volumen cargar en cada gel, de preferencia se deben de tener $100 \mu\text{g}/ 10 \mu\text{l}$, en base a esto se decidió cuantos μl se tomaban del homogenado para su preparación. Por cada $10 \mu\text{l}$ de muestra se colocaron $5 \mu\text{l}$ de buffer de carga 2X.
2. El volumen total se puso a calentar en una plancha para tubos a una temperatura de 95°C durante 5 minutos, pasando este tiempo se colocaron nuevamente las muestras en hielo.
3. Mientras tanto, se procedió a colocar en el soporte los vidrios armados, para comenzar a hacer los geles para la electroforesis, y se verificó que no existieran fugas colocando un poco de agua entre ellos.
4. Se vertieron aproximadamente 4.5 ml de la mezcla de gel separador al 10 %, para después colocar un poco de alcohol isopropílico y así eliminar las burbujas que pudiesen haber quedado. Se esperó a que el gel seicara por alrededor de 20 minutos.
5. Una vez seguros que el gel separador estaba seco, se vertió el gel concentrador y colocó el peine para generar los pozos donde se colocaron las muestras, se esperaron aproximadamente 20 minutos para que seicara.
6. Se retiró el peine y limpió con agua, y después se quitó el exceso de agua de los pozos.
7. Se armó la caja donde se corrieron los geles y vertió la cantidad necesaria de buffer de corrida 1X, al nivel de las marcas indicadas en las cajas.
8. Los pozos fueron cargados con el marcador de peso molecular adecuado y con los volúmenes de la muestra problema ya mezclada con el buffer de carga.
9. Se colocó la tapa con los electrodos y corrió la parte del gel concentrador a 80V, mientras que el gel separador se corrió a 120V.
10. Terminada la corrida de los geles, se sacaron de los vidrios y cortaron de la parte correspondiente al gel concentrador.

11. Uno de los geles se colocó en colorante azul de Coomasie inmediatamente, mientras que el otro servirá para hacer la transferencia.

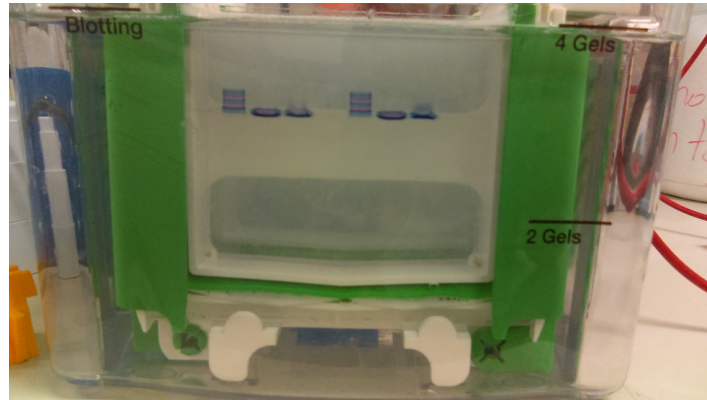


Figura 6.12: Electroforésis en marcha, se puede observar la separación, de acuerdo a su peso molecular, de las proteínas correspondientes al marcador de peso molecular empleado

6.4.4. Transferencia

1. Se colocó el gel en buffer de transferencia para equilibrarlo
2. Mientras que se cortó una membrana de PVDF del tamaño del gel, tratando de hacerlo lo más exacto al tamaño del gel para que la transferencia sea mejor.
3. Se cortaron también dos papel filtro extra grueso y así mismo se colocaron en buffer de transferencia para equilibrarse de igual manera
4. Se vertió un poco de buffer de transferencia frío en el equipo transblot y colocó uno de los papeles filtro cuidando de quitar las burbujas que se generaron con la ayuda de un rodillo
5. Se colocó sobre el papel filtro la membrana de PVDF y se quitaron las burbujas generadas, para proceder a la colocación del gel, cuidando de igual manera que no existan burbujas, para por último, colocar el segundo papel filtro y cerrar el equipo de transblot.
6. Se corrió a 15V por un tiempo de 1 hora con 30 minutos para que la transferencia de proteínas del gel a la membrana se hiciera por completo

7. Una vez terminado el tiempo, se sacó la membrana y se colocó en rojo de Ponceau durante 20 minutos para poder visualizar las proteínas transferidas a la membrana; así mismo se colocó el gel posterior a la transferencia en azul de coomasie para verificar que la transferencia se haya dado por completo
8. Transcurrido el tiempo para la tinción de la membrana, se colocó en TBS-T para retirar el exceso de colorante y proseguir.

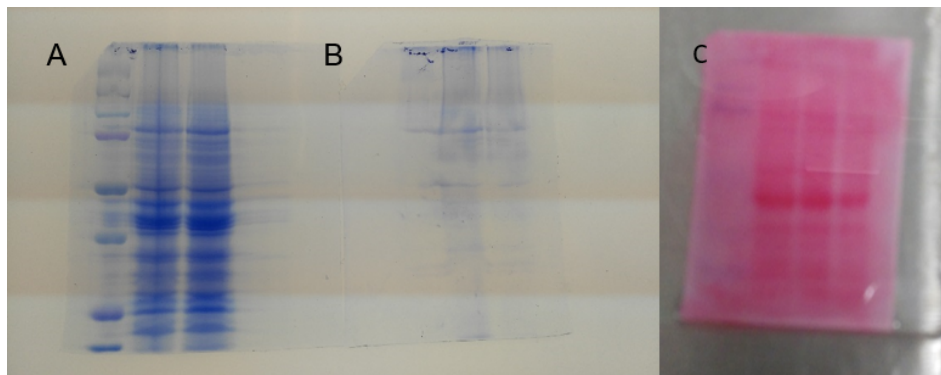


Figura 6.13: (A) Gel resultante de la electroforesis teñido con azul de Coomasie, se observan las bandas azules correspondientes a la proteína de la muestra. B) Gel teñido con azul de Coomasie posterior a la transferencia de proteínas a la membrana. C) Membrana de PVDF con las proteínas transferidas y teñida con colorante rojo de Ponceau que permite visualizar las proteínas mediante la tonalidad roja

6.4.5. Incubación con anticuerpos

1. Se colocó la membrana en leche blot al 5 % y dejó toda la noche en agitación para que se realizara el bloqueo.
2. Al siguiente día se sacó la membrana y enjuagó con TBS-T tres veces, durante 30 minutos; y se procedió a colocar en leche blot 1 % con el anticuerpo primario correspondiente, dejándolo toda la noche a 4°C con agitación.
3. Transcurrido el tiempo de incubación con anticuerpo primario se realizaron tres enjuagues con TBS-T durante 10 minutos cada uno, en agitación, para posteriormente sumergir la membrana en leche blot 1 % con el anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación.

4. Se procedió a revelar colocando la mezcla del kit ECL de ThermoFisher sobre la membrana durante 5 minutos.

6.4.6. Fotodocumentación

1. El equipo MicroChemi se debe de encender y abrir el programa GelCapture y esperar hasta que marque que la cámara está lista para usarse
2. Se colocó la membrana en un separador de hojas, con la mezcla del kit de ECL y habiendo transcurrido el tiempo indicado, y quitarle las burbujas, de existir alguna.
3. Se seleccionó el tiempo de exposición y tipo de resolución para la adquisición de la imagen y se inició la captura.
4. Obtenida la imagen se hicieron las modificaciones necesarias para obtener una mayor nitidez de la membrana y se procedió a guardar cada una de las imágenes.
5. Los resultados obtenidos se leyeron mediante la técnica de densitometría en el programa ImageJ.

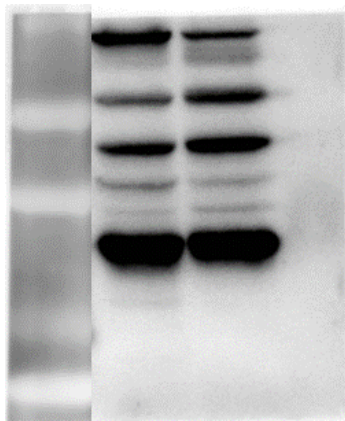


Figura 6.14: Imagen de la membrana de PVDF revelada mediante quimioluminiscencia, en donde las bandas negras indican las proteínas con las que reaccionaron los anticuerpos

Este protocolo fue el mismo que se empleó para la determinación de las enzimas COX 2 y tromboxano sintasa, empleando el anticuerpo primario y secundario requerido para cada una de ellas

7

Resultados

Antes de realizar cualquier experimento se pesaba a los ratones para conocer el peso promedio de cada grupo, en la Figura 7.1 se pueden apreciar los datos obtenidos, en donde es observable que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa presentaban un mayor peso, de aproximadamente 45 gramos; mientras que el grupo control tuvo un peso promedio de sólo 17 gramos.

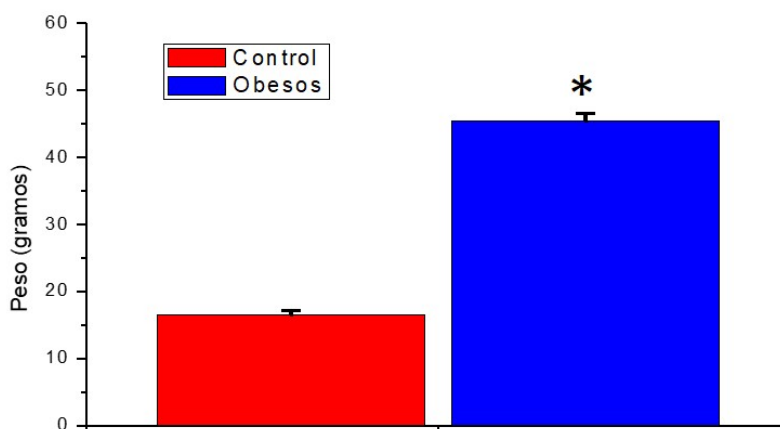


Figura 7.1: Peso promedio de los ratones C57BL6 empleados en el experimento, el grupo control mostrado en rojo y el grupo obeso en azul.

Debido a la evidente diferencia en pesos entre ambos grupos, se quiso determinar si el periodo de 8 semanas de cambio en la alimentación por una dieta alta en grasa tenía algún efecto en las arterias aorta y coronarias, por lo que se empleó la técnica de tinción con aceite rojo O, de lo que se obtuvieron imágenes mostradas en la Figura 7.2, en donde podemos ver en (A) un corte de la arteria aorta perteneciente a uno de los

animales del grupo control, es observable la poca cantidad de coloración roja, la cual se da debido a la interacción del aceite rojo O con las moléculas grasas; mientras que en (B) se presenta un corte perteneciente al grupo obeso, y en esta imagen salta a la vista la coloración roja, correspondiente a la cantidad de grasa presente en el tejido aórtico. El análisis estadístico de las imágenes analizadas es mostrado en la Figura 7.3, en donde se puede ver que la cantidad de grasa presente en el tejido, medida mediante la intensidad de coloración roja, es mucho mayor en el grupo obeso en comparación al grupo control, siendo esta diferencia significativa a un nivel de 0.05.

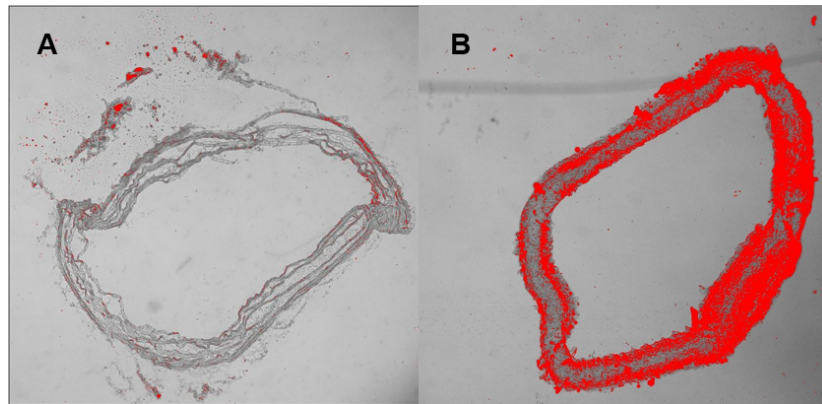


Figura 7.2: Cortes correspondientes a arterias aorta de los grupos control (A) y obeso (B), en donde una mayor coloración roja indica mayor presencia de grasas

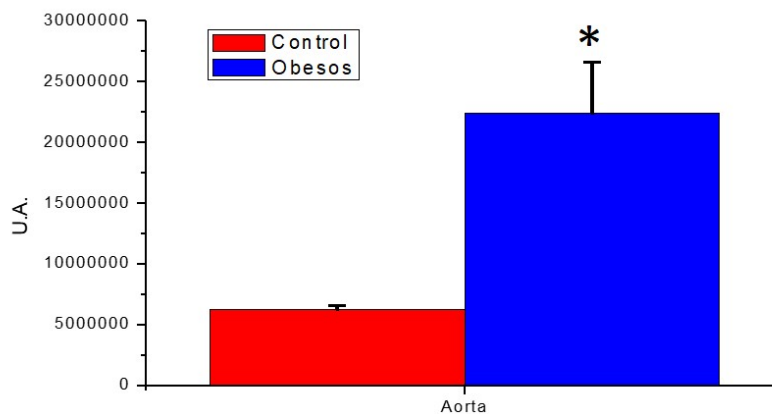


Figura 7.3: Contenido de grasa en las arterias aorta de los grupos control y obesos, medida en relación a la intensidad de color rojo mostrada en unidades arbitrarias (U.A.)

De la misma manera, se verificó si existían acumulaciones de grasa en las arterias

coronarias, encontrando de igual manera que en las arterias aorta, que el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (Figura 7.4 derecha) mostraba una mayor cantidad de grasa en el tejido en comparación al grupo control (Figura 7.4 izquierda), de acuerdo a la intensidad de coloración roja que cada grupo mostró, que en promedio se muestra en la Figura 7.5.

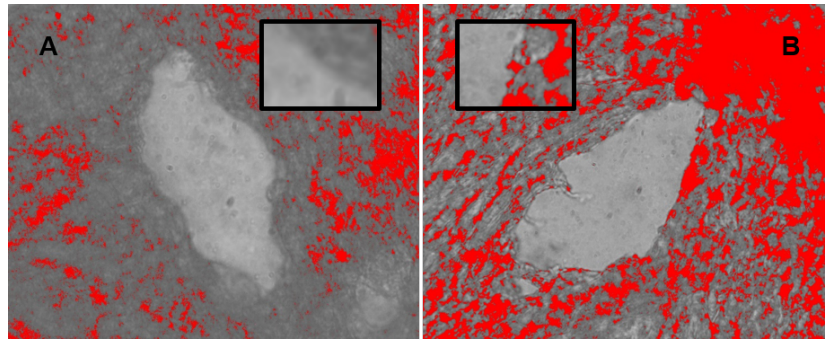


Figura 7.4: Cortes correspondientes a arterias coronarias de los grupos control (A) y obeso (B), en donde una mayor coloración roja indica mayor presencia de grasas, el cual se observa tanto en el tejido cardiaco como en el tejido arterial. En los recuadros de ambas figuras se observa un zoom a las paredes arteriales mostrando mayor contenido de grasas en el grupo obeso.

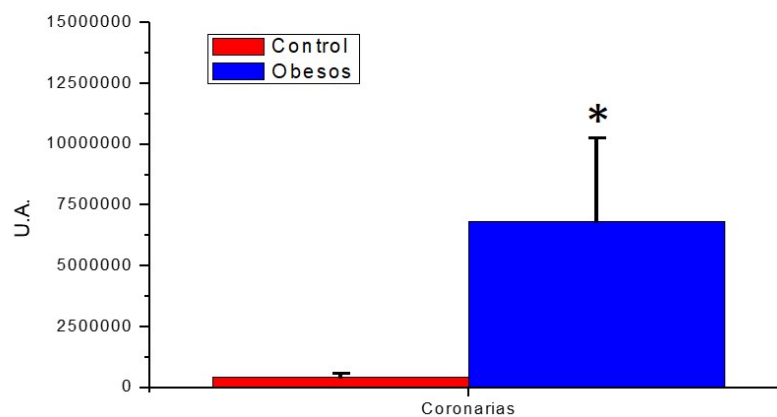


Figura 7.5: Contenido de grasa representado por la intensidad de color rojo mostrada en unidades arbitrarias (U.A.) en las arterias coronarias de ambos grupos analizados

7.1. Demostrar que la respuesta contráctil inducida por ácido araquidónico en ratones obesos se ve aumentada

Para demostrar si existía una diferencia en el metabolismo del ácido araquidónico durante periodos de obesidad, lo primero que se hizo fue registrar los cambios en la presión de perfusión coronaria (PPC) en los corazones de ambos grupos tras ser administrada una dosis de ácido araquidónico. En la Figura 7.6 podemos observar que, tras la administración de la dosis de ácido araquidónico, en el grupo control, existe un ligero incremento de aproximadamente 30 mmHg en la PPC, para ir disminuyendo en la ventana de tiempo mostrada.

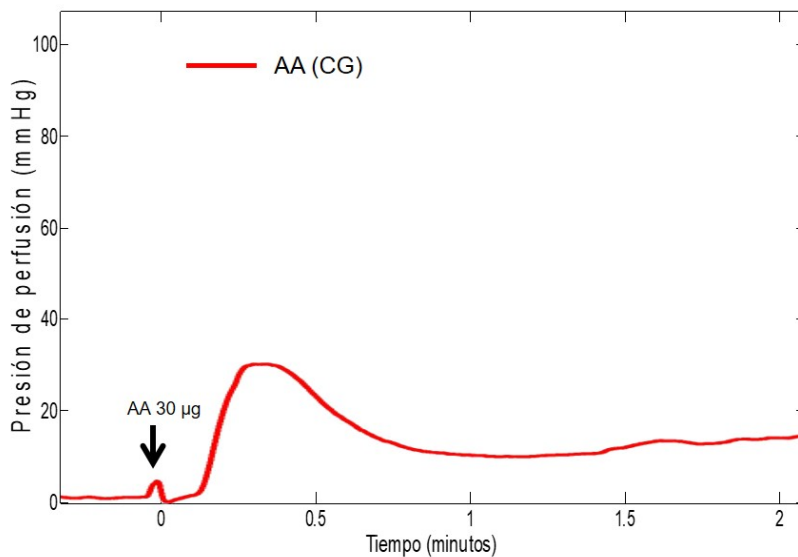


Figura 7.6: Trazo representativo del incremento en la PPC en corazones del grupo control tras la administración de una dosis de AA.

Sin embargo, cuando se administró la misma dosis de ácido araquidónico a corazones provenientes de ratones que fueron sometidos a una dieta alta en grasas, las respuestas se vieron modificadas, como se muestra en la Figura 7.7, en donde es observable que el incremento en la presión de perfusión coronaria fue mucho mayor en comparación al grupo control, así mismo, la contracción mostrada fue sostenida durante la misma ventana de tiempo, no presentando la misma relajación que el grupo control.

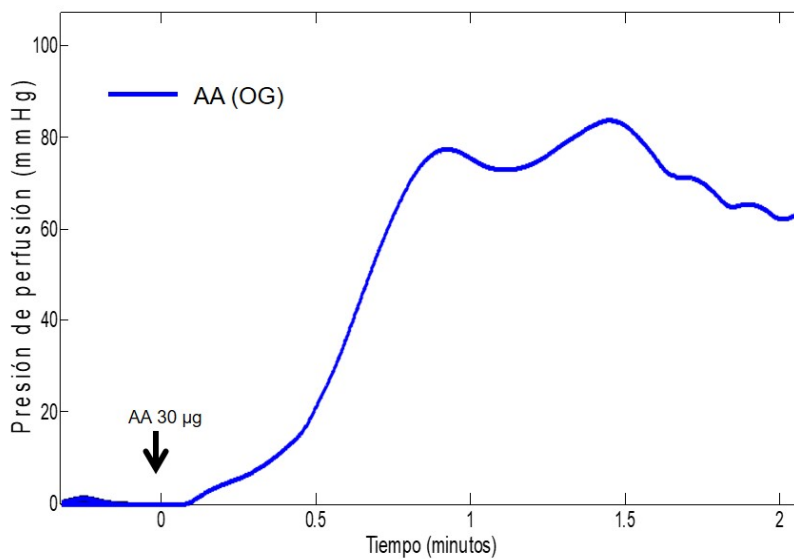


Figura 7.7: Trazo representativo del incremento en la presión de perfusión coronaria en corazones provenientes de animales del grupo obeso tras la administración de la dosis de AA

De cada uno de los grupos se realizaron cinco repeticiones, encontrando, como es mostrado en la Figura 7.8, que la respuesta al ácido araquidónico se vio incrementada en aproximadamente tres veces más en el grupo obeso en comparación al grupo control. Tras el análisis estadístico, se encontró que esta diferencia era significativa.

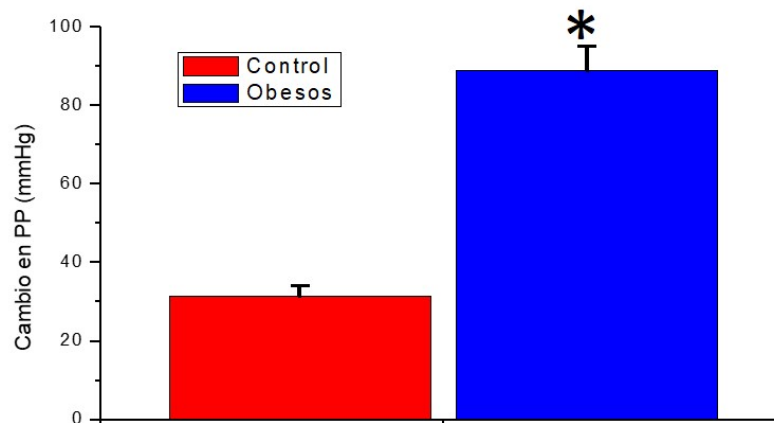


Figura 7.8: Incremento en la presión de perfusión coronaria. Se observa que el grupo obeso presenta un mayor incremento en la PPC tras la administración de la dosis de ácido araquidónico, en comparación al grupo control en el mismo periodo de tiempo. $p < 0.05$

Una vez que se observó que la respuesta a la misma dosis de ácido araquidónico era diferente en ambos grupos y que se veía incrementada en el grupo obeso, fue necesario determinar cuál molécula era la responsable directa del incremento en la presión de perfusión coronaria, si el ácido araquidónico por si mismo o alguno de los metabolitos resultantes por acción de la enzima COX, por lo que se empleó el fármaco indometacina que se encarga de bloquear la acción de esta enzima y por lo tanto la formación de prostanoïdes. De esto pudimos observar que en ambos grupos, control y obeso, la respuesta al ácido araquidónico se ve bloqueada al no existir incremento en la presión de perfusión coronaria. (Figura 7.9)

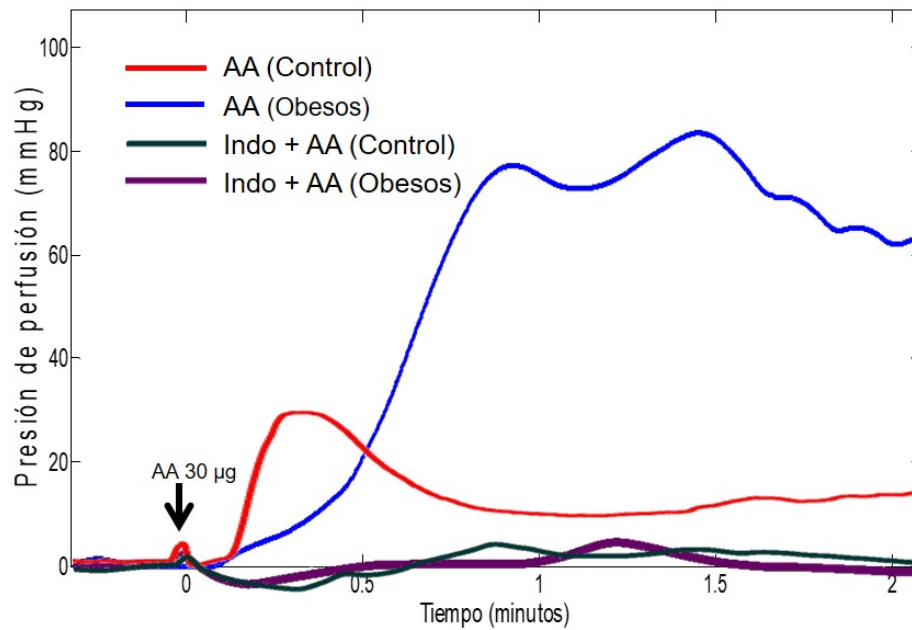


Figura 7.9: Tras la administración de la dosis de AA al grupo control (rojo) se registró un incremento en la presión de perfusión coronaria, la cual se vio bloqueado mediante la perfusión del fármaco indometacina (verde). Mientras que para el grupo obeso (azul) que también registraba un incremento en la presión de perfusión, cuando se le perfundió con indometacina de igual manera la respuesta se vio inhibida (púrpura).

7.2. Identificar el metabolito del ácido araquidónico responsable de la respuesta coronaria

El análisis de los perfusados mostró que entre ambos grupos, control y obeso, no existen diferencias significativas en cuanto a las cantidades liberadas de PGI₂, ni previo a la administración del ácido araquidónico o posteriormente a esta. (Figura 7.10)

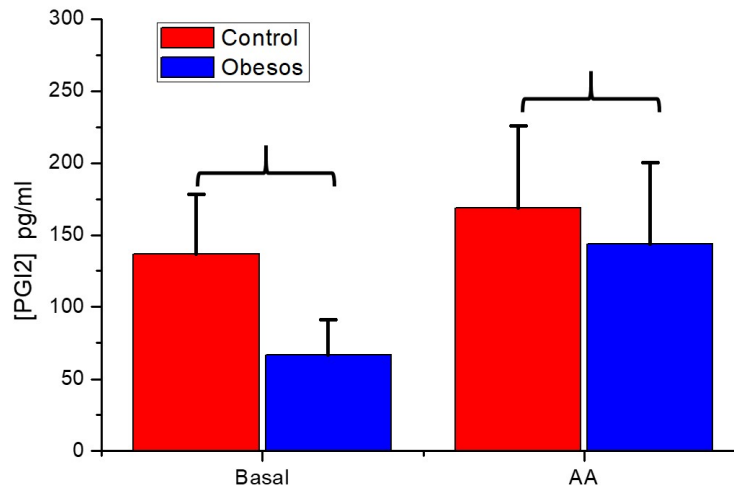


Figura 7.10: Medición de PGI₂ en perfusados previos (Basal) y posteriores a la estimulación con ácido araquidónico (AA). En estado basal la cantidad de PGI₂ era mayor en el grupo control en comparación al grupo obeso, sin existir diferencia significativa ($p < 0.05$). Tras la administración de ácido araquidónico la diferencia entre ambos grupos siguió siendo no significativa.

Por otro lado, las cantidades liberadas de TXB₂ sí mostraron diferencia entre ambos grupos, así como entre condiciones basales y posteriormente a la administración de ácido araquidónico, siendo el grupo obeso el que liberó una mayor cantidad de este metabolito y el que mostró un incremento evidente tras la dosis de ácido araquidónico, tal como se muestra en la Figura 7.11.

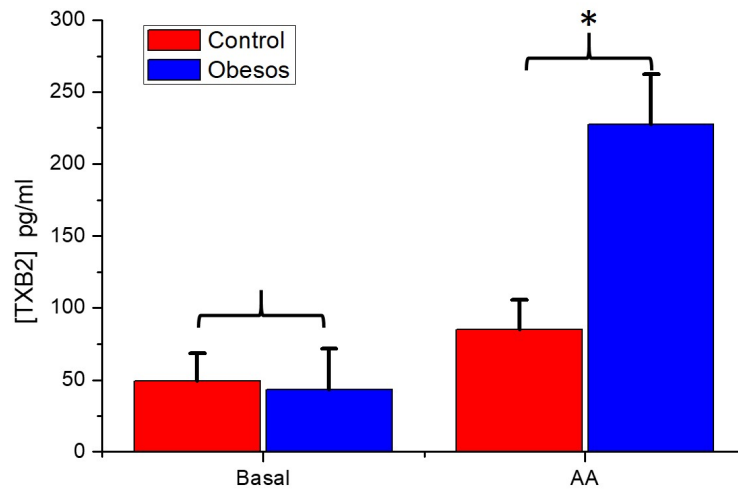


Figura 7.11: La liberación de TXB2 en condiciones basales fue muy similar en ambos grupos. Sin embargo tras la administración de AA el grupo obeso (azul) presentó un incremento notable en las cantidades producidas de TXB2 en comparación al grupo control (rojo). * $p < 0.05$

7.3. Caracterizar el mecanismo responsable del cambio en el metabolismo del ácido araquidónico

Las figuras 7.11 y 7.10, sugieren que el metabolito que se está sintetizando mayormente durante la obesidad es el tromboxano A₂, por lo cual nos enfocamos en él. Para la caracterización del mecanismo responsable del cambio en el metabolismo de AA durante periodos de obesidad se determinó primeramente si existía algún cambio en las proteínas presentes en la vía de señalización; para observar si las proteínas disminuían, incrementaban o permanecían en igual cantidad, se empleó la técnica de Western Blot.

La isoforma de la enzima COX2 muestra un incremento en la densidad relativa promedio en el grupo obeso en comparación con el grupo control de aproximadamente 4 veces más (Figura 7.12 B), lo que significa que la enzima se está viendo mayormente expresada en los ratones obesos que en los ratones alimentados con la dieta estándar (Figura 7.12 A).

En cuanto a la medición de Tromboxano sintasa (TXS) se encontró que, de igual

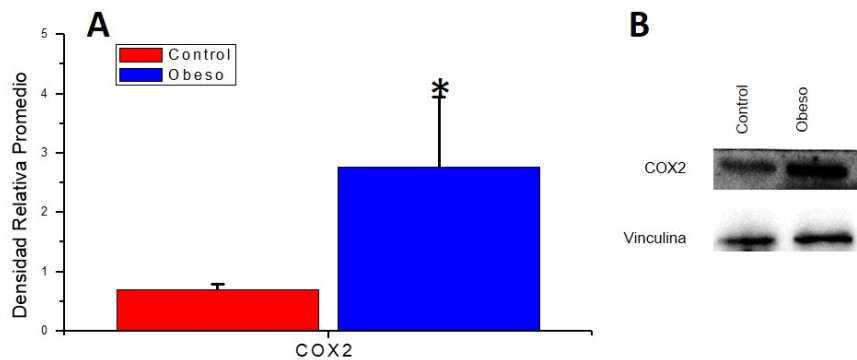


Figura 7.12: Medición de la enzima COX2 por medio de Western Blot. Se observa una mayor expresión de la enzima en el grupo obeso en relación al grupo control (A), esto a partir del análisis de imágenes de las bandas obtenidas por Western Blot (B). $p < 0.05$

manera que COX2, durante periodos de obesidad se ve mayormente expresada en el tejido cardiaco proveniente de animales alimentados con una dieta alta en grasas, tal como se muestra en la Figura 7.13 A, en donde podemos ver que el grupo control únicamente presenta una densidad relativa promedio de 0.5, mientras que el grupo obeso tiene poco mas del doble de esto. Así mismo en la Figura 7.13 B, podemos apreciar a simple vista que la densidad de la banda correspondiente a la enzima TXS en el grupo obeso es mayor. Para la realización de estos experimentos se empleó como control de carga a la proteína vinculina, como se muestra en las figuras 7.12 B y 7.13 B.

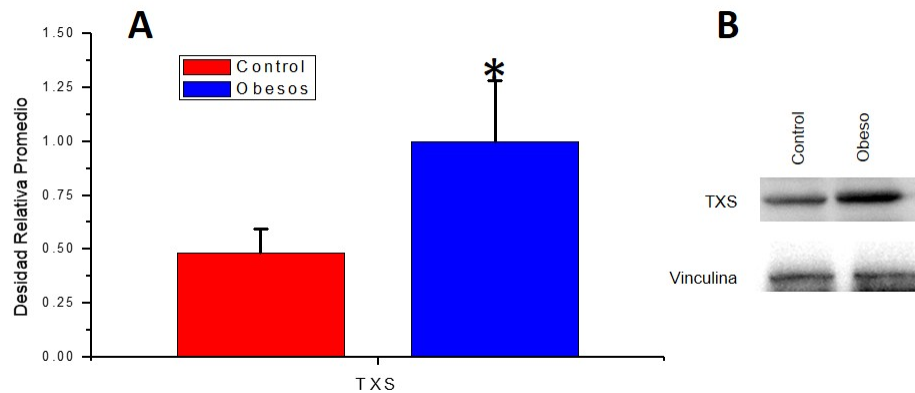


Figura 7.13: Medición de TXS mediante Western Blot. Tras la medición de la enzima tromboxano sintasa por medio de Western Blot se encontró que esta se ve mayormente expresada en periodos de obesidad (azul) en comparación al grupo control (rojo). La Figura 7.13 B muestra una imagen representativa de los blots empleados para la obtención de estos datos. $p < 0.05$

7.3.1. Bloqueo en la síntesis de tromboxano A2

Para tener la certeza de que el incremento en la presión de perfusión coronaria, mostrado tras la administración de ácido araquidónico (Figuras 7.6 y 7.7), es debida a la acción del metabolito tromboxano A2 se empleó el fármaco 1-Benzylimidazol, el cual se encarga de bloquear a la enzima tromboxano sintasa, encargada de la formación del metabolito tromboxano. Tras realizar la perfusión con 1-Benzylimidazol, se encontró que en ambos grupos la respuesta a la administración de ácido araquidónico se ve bloqueada, aunque se muestra un mayor bloqueo de la respuesta en el grupo control que en grupo obeso, tal como se muestra en la figuras 7.14 y 7.15

7. Resultados

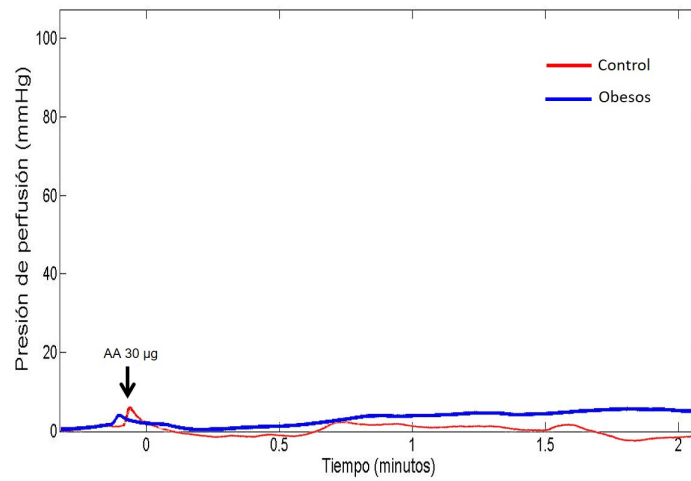


Figura 7.14: Perfusión de 1-Benzylimidazol. Se muestra el bloqueo de la respuesta a la administración de AA, inhibiendo la enzima tromboxano sintasa y la formación del metabolito tromboxano

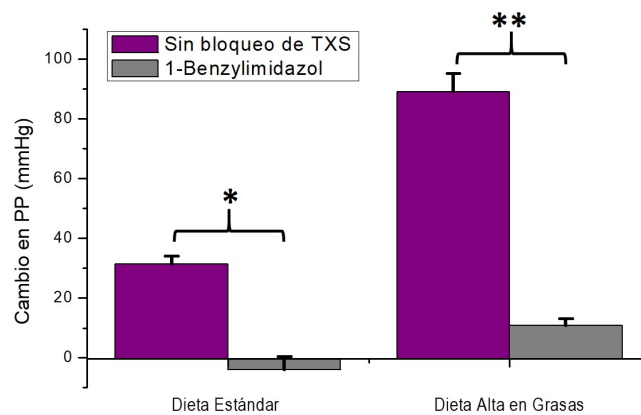


Figura 7.15: Mediante el empleo del fármaco 1-Benzylimidazol (gris) se bloqueó la formación de tromboxano, impidiendo así una contracción en los corazones de ambos grupos, en comparación a una perfusión normal (Lila) en donde la contracción era mayor en el grupo obeso.

7.3.2. Cambio en el número de receptores

Habiendo notado que existen cambios en la cantidad relativa de las enzimas que intervienen en la conversión de ácido araquidónico a tromboxano A₂, se realizaron experimentos para saber qué receptores podrían presentar cambios y ser los que estaban provocando la respuesta contráctil al AA, para lo cual se empleó el fármaco U46619, que es un agonista específico de los receptores de tromboxano A₂, quedando con esto descartada la participación del receptor de PGH₂ que también interacciona con el metabolito tromboxano A₂. De estos experimentos se encontró que el grupo alimentado con la dieta alta en grasas es el que mostraba un mayor incremento en la presión de perfusión coronaria tras ser administrada la dosis de 0.7 μg de U46619 en comparación al grupo control, tal como se muestra en la Figura 7.17 y en la Figura 7.16

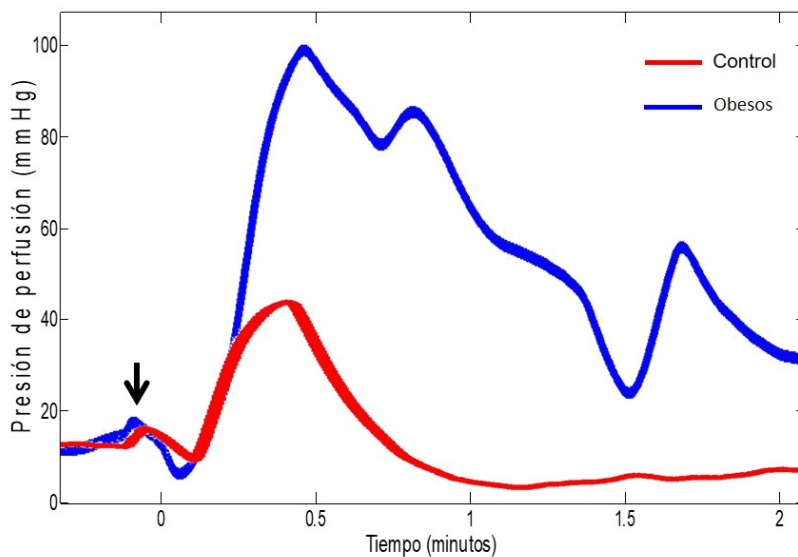


Figura 7.16: Trazos representativos del efecto producido tras la administración de U46619 (flecha) a corazones control (rojo) y obesos (azul), siendo este último grupo el que mostró un mayor incremento en la presión de perfusión coronaria.

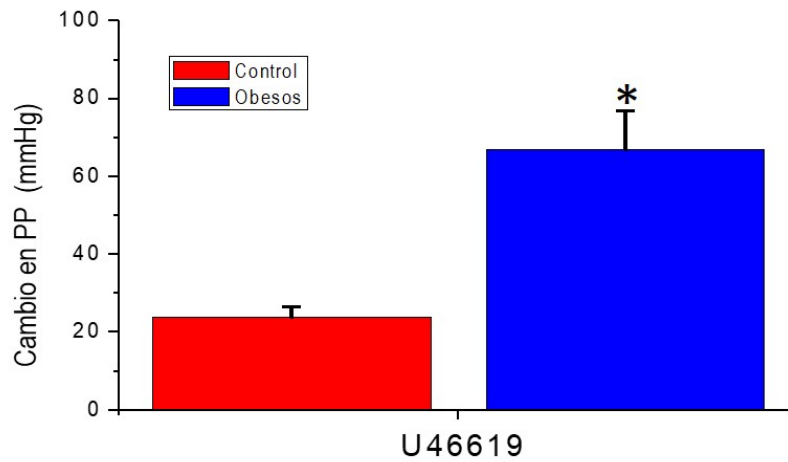


Figura 7.17: El empleo del fármaco agonista selectivo del receptor de tromboxano A₂, U46619, mostró que el grupo obeso ve incrementada en aproximadamente tres veces más la respuesta al AA en comparación al grupo control, siendo esta diferencia significativa a un nivel de 0.05 de confianza.

8

Discusión

Existen numerosos trabajos acerca de obesidad y las enfermedades que de ella derivan, sin embargo, previamente no había sido reportado que existiera alguna modificación en el tejido arterial a causa de esto. En el presente trabajo demostramos que, empleando como modelo a ratones C57/BL6, solo bastan 8 semanas con una dieta alta en grasas para provocar cambios en la estructura del tejido aórtico y coronario, así como la existencia de acumulación de grasa en todo el tejido cardiaco en comparación al tejido de los animales que se mantuvieron alimentados con una dieta estándar, si bien previamente había sido mostrado por Virchow ^[58,59] que existían cambios en la capa íntima de las arterias durante el desarrollo de patologías como la aterosclerosis, en nuestro trabajo demostramos que todas las capas de las arterias analizadas presentan cambios significativos.

Debido a estos cambios en la estructura de las arterias el metabolismo del ácido araquidónico estaría viéndose modificado, ya que en animales obesos se registró un incremento importante en la respuesta al ácido araquidónico siendo mayor la presión de perfusión coronaria registrada en corazones provenientes de animales obesos en comparación al grupo control, y esto podría deberse a la acumulación de triglicéridos mostrada mediante la tinción con aceite rojo O, que previamente se ha relacionado el incremento de triglicéridos y ácidos grasos libres con el incremento en la presión sanguínea ^[60].

Mediante la perfusión realizada con indometacina y los resultados arrojados por estos experimentos, podemos decir que no es el ácido araquidónico por si mismo el responsable directo del incremento en la presión de perfusión coronaria en ninguno de los dos grupos, sino que el metabolito responsable de esto es el tromboxano A₂, lo cual se

corroboró mediante los análisis de ELISA realizados a los perfusados obtenidos. Cabe hacer mención que por parte de Escoubet y colaboradores ^[61], quienes emplearon ratas Zucker para sus experimentos, determinaron mediante cromatografía que el prostanoide que mayormente se sintetizaba tanto en grupos control como obeso era siempre la prostaciclina (PGI₂); sin embargo, el trabajo realizado por Hodnett y colaboradores ^[62] llevado a cabo mediante el estímulo de AA en arterias femorales muestra que las arterias provenientes de animales obesos tienen una disminución de PGI₂ en comparación al grupo control y el nivel de TXA₂ permanecía igual en ambos grupos; mientras que tras nuestro trabajo podemos decir que el metabolito TXA₂ se está viendo incrementado en la circulación coronaria, , por lo que nuestros resultados estarían apuntando a que el responsable directo del incremento en la presión de perfusión coronaria es este metabolito y no la disminución en las cantidades de PGI₂, y esto se corroboró tras la perfusión realizada con el inhibidor 1-Benzylimidazol que se empleó para bloquear la síntesis del mismo, se encontró también que las cantidades de PGI₂ (sin ser significativas) se incrementan ligeramente en el grupo obeso para, lo que supondría, contrarrestar el incremento de TXA₂ y tratar de regular la presión arterial.

Así mismo, nuestros resultados en cuanto a la modificación de las proteínas que intervienen en la producción de TXA₂, estarían indicando que al igual que en otras patologías como cáncer^[63–67], las enzimas TXS y COX-2 se están viendo incrementadas durante periodos de obesidad; contrario a lo que muestra Escoubet y colaboradores ^[61], quienes mencionan que durante periodos de obesidad el metabolismo del ácido araquidónico por medio de la enzima COX no se ve afectado, tras nuestros resultados podemos decir que la enzima COX-2 se está viendo incrementada favoreciendo con ello la generación de PGH₂ y su subsecuente transformación a TXA₂ por medio del incremento que reportamos de la enzima TXS.

En estudios recientes por Hester y colaboradores^[68], se sugiere que la dilatación arterial está deteriorada en ratas Zucker obesas como resultado de alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico, lo que resulta en la activación de los receptores de tromboxano, lo que se ve enfatizado por los resultados que nosotros mostramos al

emplear el fármaco U46619, con el cual demostramos que durante periodos de obesidad la sensibilidad al metabolito tromboxano se ve incrementada, favoreciendo con esto la vasoconstricción de las arterias coronarias, incrementando a su vez la presión de perfusión coronaria.

En resumen, nuestros resultados sugieren que durante periodos de obesidad existe un incremento en la actividad de la vía de señalización del tromboxano, generando una mayor cantidad de este y volviéndose las células mayormente sensibles a la presencia de este metabolito al existir una mayor cantidad de receptores (o bien al incrementarse su receptividad al metabolito); sin embargo, estos resultados hacen que surja una importante interrogante, y es sobre la naturaleza del tromboxano generado; si bien en ambos grupos existe liberación de tromboxano, este trabajo fue realizado con un sistema de órgano aislado, el cual se encuentra libre de plaquetas, que es el sitio conocido de síntesis de este metabolito^[31–33], por lo que a partir de nuestros datos tendríamos que suponer que existe una fuente alterna para la síntesis de tromboxano A₂, pudiendo ser el tejido cardiaco en su totalidad o bien el tejido endotelial, que tras años de investigación sigue arrojando datos sobre su funcionamiento.

9

Conclusión

Durante periodos de obesidad, el incremento en la generación del metabolito tromboxano, es debido a una mayor expresión de las enzimas COX y tromboxano sintasa, y a la par, el tejido cardiaco podría estar acrecentando su sensibilidad a este metabolito, provocando con todos estos factores un incremento en la presión de perfusión coronaria.

10

Perspectivas

Los resultados obtenidos mediante este trabajo de investigación, abren una serie de nuevas preguntas que resultaría bastante interesante investigar; una de ellas, es respecto a la mayor expresión que las enzimas generadoras del metabolito tromboxano están teniendo durante periodos de obesidad, porque se ignora hasta el momento qué puede estar generando estos cambios en las enzimas, cuál es el mecanismo que permite esta sobre expresión durante la obesidad. Así mismo, otra de las preguntas surgidas tras este trabajo, tiene que ver con la generación del metabolito tromboxano en el órgano aislado, ya que por la metodología que empleamos, la carencia de plaquetas en nuestro arreglo experimental nos llevaría a pensar que no se generaría dicho metabolito, sin embargo, nuestros resultados muestran una cantidad considerable del mismo, por lo que sería sumamente interesante poder investigar la fuente de producción de este metabolito en el tejido cardiaco del sistema de órgano aislado.

Bibliografía

- [1] Frigolet, M. E., Torres, N., and Tovar, A. R. (2013). The renin–angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(12), 2003-2015.
- [2] WHO. Obesity and overweight. 2013. p. Fact sheet N311.
- [3] Traupe, T., Lang, M., Goettsch, W., Münter, K., Morawietz, H., Vetter, W., and Barton, M. (2002). Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor gene expression. *Journal of hypertension*, 20(11), 2239-2245.
- [4] Hayakawa, M., Ishida, N., Takeuchi, K., Shibamoto, S., Hori, T., Oku, N., ... y Tsujimoto, M. (1993). Arachidonic acid-selective cytosolic phospholipase A2 is crucial in the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 11290-11295.
- [5] Piomelli, D. (1993). Arachidonic acid in cell signaling. *Current opinion in cell biology*, 5(2), 274-280.
- [6] Smith, J. B. (1980). The prostanoids in hemostasis and thrombosis: a review. *The American journal of pathology*, 99(3), 743.
- [7] Bhagat, B., Dhalla, N. S., Ginn, D., Montagne, A. E., and Montier, A. D. (1972). Modification by prostaglandin E2 (PGE2) of the response of guinea-pig isolated vasa deferentia and atria to adrenergic stimuli. *British journal of pharmacology*, 44(4), 689-698.
- [8] Needleman, P., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., and Lefkowitz, J. B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 69-102.

- [9] Bogatcheva, N. V., Sergeeva, M. G., Dudek, S. M., and Verin, A. D. (2005). Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvascular research*, 69(3), 107-127.
- [10] Moncada, S., Ferreira, S. H., and Vane, J. R. (1978). Pain and inflammatory mediators. In *Inflammation* (pp. 588-616). Springer Berlin Heidelberg.
- [11] Dumancas, G. (2013) Arachidonic acid: dietary sources and general functions. Nova science publishers.
- [12] Crawford, M. A., and Sinclair, A. J. (1972). Lipids, malnutrition and the developing brain. by K. Elliot et al., Assoc. Scientific Publisher, London, 267.
- [13] Davies, P., Bailey, P. J., Goldenberg, M. M., and Ford-Hutchinson, A. W. (1984). The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annual review of immunology*, 2(1), 335-357.
- [14] Roman, R. J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological reviews*, 82(1), 131-185.
- [15] Maples, R. D. Arachidonic Acid Food Sources and Recommendation for the Vegetarian. *ARACHIDONIC ACID*, 21.
- [16] Pla, A. F., and Munaron, L. (2001). Calcium influx, arachidonic acid, and control of endothelial cell proliferation. *Cell calcium*, 30(4), 235-244.
- [17] Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1973). Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(3), 899-903.
- [18] Nugteren, D. H., and Hazelhof, E. (1973). Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 326(3), 448-461.
- [19] Vane, J. R. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature*, 231(25), 232-235.
- [20] Smith, W. L., DeWitt, D. L., and Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 145-182.

-
- [21] Bjorkman, D. J. (1998). The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins. *The American journal of medicine*, 105(1), 8S-12S.
- [22] Hla, T., and Neilson, K. (1992). Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proceedings of the national academy of sciences*, 89(16), 7384-7388.
- [23] Williams, C. S., and DuBOIS, R. N. (1996). Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms?. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270(3), G393-G400.
- [24] Morita, I., Schindler, M., Regier, M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., and Smith, W. L. (1995). Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 270(18), 10902-10908.
- [25] Vane, J. R., Bakhle, Y. S., and Botting, R. M. (1998). CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 38(1), 97-120.
- [26] Galley, H. F., and Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia*, 93(1), 105-113.
- [27] Sandoo, A., van Zanten, J. J. V., Metsios, G. S., Carroll, D., and Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The open cardiovascular medicine journal*, 4, 302.
- [28] Thomas, D. W., Mannon, R. B., Mannon, P. J., Latour, A., Oliver, J. A., Hoffman, M., and Coffman, T. M. (1998). Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *Journal of Clinical Investigation*, 102(11), 1994.
- [29] Marwali, M. R., and Mehta, J. L. (2006). COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies *Thromb Haemost*, 96, 401-6.
- [30] Bunting, S., Moncada, S., and Vane, J. R. (1983). The prostacyclin-thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications.
- [31] Moncada, S., and Vane, J. R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacological reviews*, 30(3), 293-331.

- [32] Needleman, P., Moncada, S., Bunting, S., Vane, J. R., Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1976). Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature*, 261(5561), 558-560.
- [33] Moncada, S., Needleman, P., Bunting, S., and Vane, J. R. (1976). Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating systems and their selective inhibition. *Prostaglandins*, 12(3), 323-335.
- [34] Gaetano, G., Donati, M. B., and Cerletti, C. (2003). Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*, 24(5), 245-252.
- [35] Calder, P. C., and Grimble, R. F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *European journal of clinical nutrition*, 56(S3), S14.
- [36] Tsuboi, K., Sugimoto, Y., and Ichikawa, A. (2002). Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins and other lipid mediators*, 68, 535-556.
- [37] Diczfalusy, U., Falardeau, P., and Hammarström, S. (1977). Conversion of prostaglandin endoperoxides to C17-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthase. *Febs Letters*, 84(2), 271-274.
- [38] Hammarström, S., and Falardeau, P. (1977). Resolution of prostaglandin endoperoxide synthase and thromboxane synthase of human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), 3691-3695.
- [39] Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Okuma, M., and Hayaishi, O. (1977). Solubilization and resolution of thromboxane synthesizing system from microsomes of bovine blood platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 252(16), 5871-5874.
- [40] Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental biology and medicine*, 233(6), 674-688.
- [41] Hamazaki, T., and Okuyama, H. (2003). The Japan Society for Lipid Nutrition recommends to reduce the intake of linoleic acid. In *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence* (Vol. 92, pp. 109-132). Karger Publishers

-
- [42] Ailhaud, G. (2008). Omega-6 fatty acids and excessive adipose tissue development. In *Nutrition and Fitness: Cultural, Genetic and Metabolic Aspects* (Vol. 98, pp. 51-61). Karger Publishers.
- [43] Kark, J. D., Kaufmann, N. A., Binka, F., Goldberger, N., and Berry, E. M. (2003). Adipose tissue n 6 fatty acids and acute myocardial infarction in a population consuming a diet high in polyunsaturated fatty acids. *The American journal of clinical nutrition*, 77(4), 796-802.
- [44] Baylin, A., and Campos, H. (2004). Arachidonic acid in adipose tissue is associated with nonfatal acute myocardial infarction in the central valley of Costa Rica. *The Journal of nutrition*, 134(11), 3095-3099.
- [45] Pedersen, J. I., Ringstad, J., Almendingen, K., and Haugen, T. S. (2000). Adipose tissue fatty acids and risk of myocardial infarction—a case-control study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(8), 618.
- [46] Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. *Standrad tables of food composition in Japan*. Tokyo: Japan Goverement; 2005.
- [47] Gaillard, D., Negrel, R., Lagarde, M., and Ailhaud, G. (1989). Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochemical Journal*, 257(2), 389-397.
- [48] Barton, M., Baretella, O., and Meyer, M. R. (2012). Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *British journal of pharmacology*, 165(3), 591-602.
- [49] Goossens, G. H., Blaak, E. E., and Van Baak, M. A. (2003). Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obesity Reviews*, 4(1), 43-55.
- [50] Sas, M., Gellen, J. J., Dusitsin, N., Tunkeyoon, M., Chalapati, S., Crawford, M. A. and Pinol, A. (1986). An investigation on the influence of steroidal contraceptives on milk lipid and fatty acids in Hungary and Thailand. *Contraception*, 33(2), 159-178.

- [51] Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. Prostaglandins and other lipid mediators, 68, 165-175.
- [52] Sawyer, S. J., Norvell, S. M., Ponik, S. M., and Pavalko, F. M. (2001). Regulation of PGE 2 and PGI 2 release from human umbilical vein endothelial cells by actin cytoskeleton. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 281(3), C1038-C1045.
- [53] Bisgaard, H. (2001). Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. Allergy, 56(s66), 7-11.
- [54] Waldman, J. S., Marcus, A. J., Soter, N. A., and Lim, H. W. (1989). Cutaneous inflammation: effects of hydroxy acids and eicosanoid pathway inhibitors on vascular permeability. Journal of investigative dermatology, 92(1), 112-116.
- [55] Soeda, S., Honda, O., Fujii, N., and SHIMENO, H. (1997). Effect of 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid on the fibrinolytic factor release and the antithrombin binding of vascular endothelial cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 20(1), 15-19.
- [56] Brezinski, M. E., Gimbrone, M. A., Nicolaou, K. C., and Serhan, C. N. (1989). Lipoxins stimulate prostacyclin generation by human endothelial cells. FEBS letters, 245(1-2), 167-172.
- [57] Gamez-Mendez, A. M., Vargas-Robles, H., Ríos, A., and Escalante, B. (2015). Oxidative stress-dependent coronary endothelial dysfunction in obese mice. PloS one, 10(9), e0138609.
- [58] Virchow, R. (1856). Phlogose und thrombose in getissystem, gesammelte unhandlungen zur wissensehaftlichen medlein. Frankfurt-am-Main, Germany: Meidinger Sohn, 458.
- [59] Kaplan, G. A., and Keil, J. E. (1993). Socioeconomic factors and cardiovascular disease: a review of the literature. Circulation, 88(4), 1973-1998.
- [60] Frigolet, M. E., Torres, N., and Tovar, A. R. (2013). The renin–angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. The Journal of nutritional biochemistry, 24(12), 2003-2015.

- [61] Escoubet, B., Griffaton, G., Guesnet, P., Lechat, P., and Lavau, M. (1987). Prostaglandin synthesis and membrane fatty acid composition in the heart of obese Zucker rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 146(2), 589-595.
- [62] Hodnett, B. L., Dearman, J. A., Carter, C. B., and Hester, R. L. (2009). Attenuated PGI₂ synthesis in obese Zucker rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), R715-R721.
- [63] Wang, D., and DuBois, R. N. (2012). Associations between obesity and cancer: the role of fatty acid synthase.
- [64] Onguru, O., Casey, M. B., Kajita, S., Nakamura, N., and Lloyd, R. V. (2005). Cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase in non-endocrine and endocrine tumors: a review. *Endocrine pathology*, 16(4), 253-277.
- [65] Nakahata, N. (2008). Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology and therapeutics*, 118(1), 18-35.
- [66] Cailleteau, C., Liagre, B., Battu, S., Jayat-Vignoles, C., and Beneytout, J. L. (2008). Increased cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase expression is implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Analytical biochemistry*, 380(1), 26-34.
- [67] Kürzel, F., Hagel, C. H., Zapf, S., Meissner, H., Westphal, M., and Giese, A. (2002). Cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthase inhibitors differentially regulate migration arrest, growth inhibition and apoptosis in human glioma cells. *Acta neurochirurgica*, 144(1), 71-87.
- [68] Xiang, L., Naik, J. S., Hodnett, B. L., and Hester, R. L. (2006). Altered arachidonic acid metabolism impairs functional vasodilation in metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(1), R134-R138.

A

Apéndice 1

A.1. Soluciones Empleadas

A.1.1. Krebs-Heinselt (10X)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	69.2 gr
Cloruro de Potasio (KCl)	3.54 gr
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	1.63 gr
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	1.34 gr
Sulfato de Magnesio hepta hidratado (MgSO ₄ 7H ₂ O) ★	2.94 gr
Cloruro de Calcio (CaCl)	2.80 gr
Cloruro de Calcio dihidratado (CaCl2H ₂ O)★	3.66 gr
Dextrosa (C ₆ H ₁₂ O ₆) ⊗	2.00 gr
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃) ⊗	2.10 gr

Mezclar uno a uno los reactivos en aproximadamente 500 ml de agua ultrapura. Mezclar en agua por separado el CaCl, hasta disolverse por completo, verter poco a poco en la disolución anterior. Aforar a un litro, y proceder a filtrar la solución para llevarla a esterilizar. En caso de ser necesarios sustituir los reactivos marcados con ★ en caso de no contar con los reactivos no hidratados. Los reactivos marcados con ⊗ se emplearán sólo cuando se prepare solución 1X y se vaya a emplear inmediatamente.

A.1.2. Buffer pH 6.8

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	6.05 gr
Agua ultra pura	40.0 ml
Disolver el trizma y ajustar el pH con ácido clorhídrico	gotas
SDS	0.40 gr

Aforar el volumen hasta 100 ml

A.1.3. Buffer pH 7.4 (10X)

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	6.05 gr
Agua ultra pura	40.0 ml
Disolver el trizma y ajustar el pH con ácido clorhídrico	gotas
SDS	0.40 gr

Aforar el volumen hasta 100 ml

A.1.4. Buffer pH 8.8

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	91 gr
Agua ultra pura	300 ml
Disolver el trizma y ajustar el pH con ácido clorhídrico	gotas
SDS	2 gr

Aforar el volumen hasta 500 ml

A.1.5. Buffer de Lisis

Reactivo	Cantidad
Buffer pH 7.4 (1X)	100 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.80 gr
EDTA	0.058 g
IGEPAL	1.0 ml
Glicerol	5.0 ml
EGTA	0.0038 g
Ácido dioxicolico	0.10 g

A.1.6. Buffer de Carga

Reactivo	Cantidad
Glicerol	2.0 ml
SDS	4 ml
Buffer 6.8	2.5 ml
2-mercapto etanol	1.0 ml
Azul de Bromofenol	5.0 ml
Pironina	0.0038 g

A.1.7. Gel Separador 10 %

Reactivo	Cantidad
Buffer pH 8.8	2.5 ml
Acrilamida-Bis acrilamida	3.3 ml
Agua bidestilada	4.2 ml
Persulfato de Amonio 10 %	100 μ l
TEMED	5 μ l

A.1.8. Gel Concentrador

Reactivo	Cantidad
Buffer pH 6.8	0.75 ml
Acrilamida-Bis acrilamida	0.5 ml
Agua bidestilada	1.75 ml
Persulfato de Amonio 10 %	40 μ l
TEMED	2 μ l

A.1.9. Buffer de Corrida (10X)

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	30.3 gr
Agua ultra pura	1000 ml
SDS	10 gr
Glicina	144 g

Hacer buffer 1X en el momento en el que se vaya a emplear

A.1.10. Buffer de Transferencia

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	1.5 gr
Agua ultra pura	600 ml
Metanol	50 ml
Glicina	7.8 g

A.1.11. Buffer TBS (10X)

Reactivo	Cantidad
Trizma Base	30 gr
Agua ultra pura	1000 ml
Cloruro de Sodio (NaCl)	87.5 gr
Cloruro de Potasio (KCl)	0.2 g

A.1.12. Buffer TBS-T

Reactivo	Cantidad
Buffer TBS (1X)	1000 ml
Tween 20	1 ml

A.1.13. Stripping Buffer

Reactivo	Cantidad
SDS(10%)	40 ml
Trizma 1.5M	8.32 ml
2-mercapto etanol	1.6 ml
Agua	750.4 ml

A.1.14. Leche Blot

Reactivo	Cantidad
Leche en polvo Svelty	
TBS-T	

Pesar la cantidad necesaria de leche Svelty y diluir en el TBST en las cantidades necesarias para preparar la leche al porcentaje requerido

A.1.15. Solución Desteñidora

Reactivo	Cantidad
Agua	500 ml
Ácido acético	100 ml
Metanol	400 ml

A.1.16. Azul de Coomasie

Reactivo	Cantidad
Metanol	125 ml
Ácido acético	25 ml
Agua bidestilada	100 ml
Azul Coomasie	0.5 g

A.1.17. Rojo de Ponceau

Reactivo	Cantidad
Rojo de Ponceau	0.1 g
Ácido acético	5 ml
Agua bidestilada	100 ml

A.2. Fármacos empleados

A.2.1. Ácido Araquidónico 20 mM

Reactivo	Cantidad
Ácido araquidónico (sal de sodio)	25.0 mg
Alcohol Etílico (grado biología molecular)	3.90 ml

A.2.2. Acetilcolina (0.16M)

Reactivo	Cantidad
Acetilcolina	0.29 gr
Solución Krebs	1.00 ml

A.2.3. 1-Benzylimidazol

Reactivo	Cantidad
1-Benzylimidazol	0.25 gr
Solución Krebs	250 ml