

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Papel de los receptores activados por proliferador
de peroxisomas (PPAR) beta/delta en el control
de la disfunción endotelial hipertensiva**

Tesis Doctoral para aspirar
al Grado de Doctora que presenta la
Licenciada Ana María Quintela Pousa, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana María Quintela Pousa
D.L.: GR 1051-2013
ISBN: 978-84-9028-520-6



UNIVERSIDAD
DE
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

D. Julio Gálvez Peralta, Catedrático y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica: que la Tesis Doctoral titulada “Papel de los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPAR) beta/delta en el control de la disfunción endotelial hipertensiva”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. Ana María Quintela Pousa, en los laboratorios de este Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 12 de Noviembre de 2012.

Dr. Julio Gálvez Peralta



UNIVERSIDAD
DE
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

D. Juan Manuel Duarte Pérez, Dña. Rosario Jiménez Moleón y D. Manuel Sánchez Santos, Catedráticos y Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, como Directores,

Certifican: que la Tesis Doctoral titulada “Papel de los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPAR) beta/delta en el control de la disfunción endotelial hipertensiva”, presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Ana María Quintela Pousa, reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctora.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 12 de Noviembre de 2012.

Dr. Juan Manuel Duarte Pérez

Dra. Rosario Jiménez Moleón

Dr. Manuel Sánchez Santos

Agradecimientos.

“El éxito es saber que se quiere e
ir con miras hacia ello”
amqp

“Caminando en línea recta
no puede uno llegar muy lejos”
Antoine de Saint-Exupéry

“Nunca te conceden un deseo sin concederte también
la facultad para hacerlo realidad. Sin embargo,
es posible que te cueste trabajo”
Richard Bach

Quisiera mostrar mi gratitud en primer lugar a mis directores de tesis, al Dr. Juan Duarte por ser un excelente guía desde el primer día que comencé este proyecto, por su paciencia, dedicación y su capacidad para transmitirnos sus conocimientos; a la Dra. Rosario Jiménez que ha sido un apoyo constante y diario gracias al cual este proyecto ha llegado a buen término, su ayuda ha sido inestimable para mí en las presentaciones y técnicas de laboratorio y al Dr. Manolo Sánchez, mi gratitud por haberme enseñado tantas técnicas, por tu paciencia y dedicación.

A mis compañeros de cardio: a Miguel, por ser tan noble y estar siempre dispuesto a colaborar; a María José, a quien le agradezco toda la ayuda que me ha prestado, técnicas realizadas y su autenticidad; a Silvia, que aunque has estado poco tiempo, has sido una gran luz; a Pilar, una gran compañera y gran apoyo en estos años, mis mejores deseos; a Marta, por su simpatía y alegría; y a Manolo, por siempre estar dispuesto a colaborar.

Agradecer también al grupo liderado por el Dr. Julio Gálves: a Nati, una gran investigadora, llena de energía, y por si fuese poco con una gran simpática; a Francesca, por su positivismo y alegría; a Alba, siempre tan llena de energía e irradiando alegría; a Pedro, por su gran disposición para ayudar y sobre todo por su capacidad y dedicación para explicar las cosas, sin importar el tiempo que ello le lleve.

Agradecer igualmente al grupo liderado por el Dr. Fermín Sánchez de Medina: a Rocío, siempre tan trabajadora y encantadora; a Belén, una gran compañera con un gran corazón, siempre tan simpática, sonriente y carismática; a Andrea, que cautiva con su alegría y dulzura; a Isa, ya es difícil desarrollar un hemisferio, pero los dos es un milagro, gracias por tu alegría; a Borja, por vivir la investigación tan intensamente y sobre todo por tu simpatía; a Mer, por su ternura; a Cristi, por su gran disposición y paciencia para explicar; a Raquel por su amabilidad y simpatía; y a los chicos de bioquímica: Carlos, Fer y Paty.

A Mercedes, por su gran colaboración en todo, multifacética, no solo sabes donde están todos los reactivos y aparatos del lab. sino que además cuando se ha necesitado de habilidades mecánicas y eléctricas has estado allí, al paso que vas seguramente prescindiremos del servicio técnico de la facultad, además de desbordar simpatía por doquier y ser pura nobleza.

A María Elena, gracias por tus muchos consejos sobre westerns, no sé que hubiese sido de mí, tienes una capacidad envidiable para llevar a cabo a la perfección las técnicas de laboratorio, además de ser tierna y encantadora.

A Charo por la ayuda en todos los trámites que he tenido que realizar a lo largo de estos años.

Al Dr. Antonio Zarzuelo, por su interés y buenos consejos.

Agradecer igualmente a los Doctores Julio Gálves, Milagros, María Ángeles, Pilar Utrilla, Don José y Fermín Sánchez de Medina por vuestra cordialidad, y el trato afectuoso que tuvisteis para conmigo.

A Rocío, aunque no hayamos sido compañeras de laboratorio, para mí es como si lo hubiésemos sido, gracias por los buenos momentos compartidos, tu alegría y tu gran disposición para ayudarme, te debo mucho, mis mejores deseos, que la fundación vaya siempre en subida, a Isabel, gracias a la gran colaboración que me has prestado, con tan buena disposición y simpatía.

A Luis Miguel, por los momentos compartidos todas las mañanas de camino a la facultad.

Quisiera agradecer también a todos los miembros del departamento de doctorado de la escuela de postgrado, por vuestra gran ayuda con todos los trámites necesarios para el depósito de la tesis, especialmente a Juana y a Alicia.

Al Dr. Agatángelo Soler, por haberme aceptado en su laboratorio y por los muchos conocimientos transmitidos sobre microscopía y por su trato tan especial hacia mi persona, a Abraham, un gran compañero de laboratorio, gracias por los momentos compartidos y los conocimientos de estadística que

me has transmitido, habéis sido un gran grupo y me llevo los muchos y buenos momentos compartidos.

A mi mejor amiga Diana Lourenco, gracias por tus sabios consejos, por los muchos momentos compartidos, por tu apoyo incondicional, mis mejores deseos; a Alfredo Csibi, eres un ejemplo a seguir, eres el ejemplo de que cuando se quiere se puede, gracias por tu ayuda incondicional y sobre todo por tu forma de ser; a Odalis Peroza, gracias no solo por los momentos compartidos, sino también a tu infinita alegría; a Ikram Toumsy, gracias por hacerme reír tantas veces, por ser tan humana y tener un corazón tan grande; a Isabel Martínez, gracias por la frase “el no ya lo tengo”, eres maravillosa, una gran amiga; a Fátima Cabrera, el diccionario Francés-Español, siempre tan simpática.

Mi mayor agradecimiento se lo debo a mis padres, en especial a mi Madre, por su constante interés y motivación, por confiar y creer siempre en mi, todos mis logros te los debo a ti, GRACIAS. A mi hermano Miguel, por ser el mejor hermano y por enseñarme que en la vida las limitaciones físicas no condicionan nuestros sueños, y que con esfuerzo y perseverancia no hay metas inalcanzables.

A mi tío Manuel, por los momentos compartidos tanto buenos como no tan buenos, sobre todo a tu capacidad para hacer de los momentos no tan buenos, momentos llenos de gran sentido del humor, A mi tía Celia y a mi tío Manolo, por estar siempre que los hemos necesitado, tía a ver si me das el secreto de tu juventud. Al resto de tíos y tías, María del Carmen, Suso, Josefina, Olga y en especial a mi tía Fina, por estar siempre pendiente de nosotros. A todos mis primos sin excepción, en especial a Juan Diego y a Carlos, por los muchos años compartidos.

Dar las gracias también a Svetlana y a Eugen, quienes me habéis recibido en vuestra casa como a una más de la familia, por los momentos compartidos,

por vuestra alegría, positivismo y energía; y a Cristina por su gran simpatía y carisma.

Lui Radu, Pentru srijinul dat de-a lungul acestui proiect de durata, dandu-mi zilnic numai motive de fericire si incluinu-ma in viata sa, in realizarile sale, fiind persoana cea mai deosebita pe care am cunoscut-o, care m-a acceptat asa cum sunt si mi-a iluminat viata cu zambetul sau, motiv pentru care consider ca sunt norocoasa ca exista in viata mea.

A todas estas personas y a las que, por mi mala cabeza, me he dejado en el tintero. GRACIAS.

*Abreviaturas empleadas***AA**

Ácido araquidónico.

ABCA1

Transportadores de membrana dependientes de ATP.

ACh

Acetilcolina.

ADMA

Dimetil arginina simétrica.

ADP

Adenosín difosfato.

AGEs

Productos finales de glicación avanzada.

ADRP

Proteína relacionada con la diferenciación adiposa.

AF

Dominio funcional para la activación de la transcripción.

AG

Ácidos grasos.

AKT

Proteín kinasa B.

AM

Grosor de capacidad de la arteria.

AMPc

Adenosín monofosfato cíclico.

AMPK

Proteína kinasa activada por adenosín monofosfato.

AMT

Área de la transversal media.

Ang II

Angiotensina II.

AP-1

Proteína activadora-1.

apoA1

Apolipoproteína A1.

ARA-II

Antagonistas del receptor de angiotensina II.

AT-1

Receptor 1 de angiotensina II.

AT-2

Receptor 2 de angiotensina II.

ATP

Adenosín trifosfato.

AUC

Área bajo la curva.

BAECs

Célula endotelial de aorta bovina.

BCA

Ácido bicinconínico.

BCL-6

Proteína 6 del linfoma de células B.

BH₂

Dihidrobiopterina.

BH₄

Tetrahidrobiopterina.

BHT

Butilato hidroxitolueno.

BSA

Albúmina de suero bovino.

[Ca²⁺]_i

Concentración intracelular de calcio.

Cam

Calmodulina.

cAMP

Adenosín monofosfato cíclico.

Cat

Catalasa.

CCCP

m-clorocarbonilcianuro
fenilhidrazona.

cDNA

DNA complementario

cGMP

Guanosín monofosfato cíclico.

CGRP

Péptido relacionado con el gen de calcitonina.

CMLV

Célula del músculo liso vascular.

COX

Ciclooxigenasa.

cPLA₂

Fosfolipasa A₂ dependiente de calcio

CPT-1

Carnitina palmitoil transferasa- 1.

c-SRC

Tirosín kinasa independiente de receptor c-SRC.

CuZn-SOD

SOD dependiente de cobre y cinc.

DAF-2

4,5-diaminofluoresceína.

DAG

Diacilglicerol.

DAPI

Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.

db/db

Diabético.

DBD

Dominio de unión al DNA.

DE50

Dosis eficaz 50.

DHE

Dihidroetidio.

DL

Diámetro de la luz.

DMSO

Dimetilsulfóxido.

DNA

Ácido desoxirribonucleico.

DPI

Difeniléniodonio.

15d-PGJ2

Deoxiprostaglandina J2.

DM

Diabetes mellitus.

EDCF

Factor endotelal constrictor.

EDRF

Factor relajante derivado de endotelio.

EDTA

Ácido etilendiamino tetracético.

EGTAÁcido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético.**eNOS**

Óxido nítrico sintasa endotelial.

ERK 1/2

Kinasas reguladas por señales extracelulares 1/2.

ET-1

Endotelina 1.

FBS

Suero fetal bovino.

FC

Frecuencia cardíaca

FCDE

Factores contractores derivados de endotelio.

GADPH

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

GLUT

Transportador de la glucosa.

GPx

Glutation peroxidasa.

GRO

Oncogen regulador del crecimiento.

GSH

Glutación.

GST

Glutation S-transferasa.

GTP

Guanosín trifosfato.

HDL

Lipoproteínas de alta densidad.

HEPES

Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico.

HETE

Ácido hidroxieicosatetraenoico.

HODE

Ácido hidroxioctadecadienoico.

HPLC

Cromatografía líquida de alta resolución.

HSL

Lipasa sensible a hormonas.

HTA

Hipertensión arterial.

HUVEC

Células endoteliales de vena umbilical humana.

H₂O₂

Peróxido de hidrógeno.

ICAM-1

Molécula de adhesión intracelular 1.

IECA

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

IDDM

Diabetes mellitus insulino-dependiente.

IFN- γ

Interferón- γ

I κ B

Inhibidor de NF κ B.

IL

Interleukina.

iNOS

Óxido nítrico sintetasa inducible.

i.v.

Intravenosa.

IP₃

Inositol trifosfato.

I.P.C.

Índice de peso cardíaco.

iPLA₂

Fosfolipasa A₂ independiente de calcio

I.P.V.I

Índice de peso de ventrículo izquierdo.

I.P.G.

Índice de peso de la grasa visceral

I.P.H

Índice de peso del hígado

I.P.R.

Índice de peso renal.

IRS-1

Sustrato de receptor de insulina.

JNK

Kinasa c-jun-NH₂-terminal.

LBD

Dominio de unión a ligandos.

LDL

Lipoproteínas de baja densidad.

LDLR

Receptor de lipoproteínas de baja densidad.

L-NAME

N^ω-nitro-L-arginina metil éster.

Lpm

Latidos por minuto.

LPS

Lipolisacárido.

LTB₄ Leucotrieno B ₄ .	NF-κB Factor de transcripción nuclear κB.
M/L Relación media-lumen.	NFAT Factor nuclear de las células T activadas.
MAPKs Proteín kinasas activadas por mitógeno.	NO Óxido nítrico.
MCP-1 Proteína quimiotáctica de monocitos 1.	NOS Óxido nítrico sintasa.
MDA Malonildialdehido.	NPS Nitroprusiato sódico.
MMPs Metaloproteasas de matriz.	NRF-1 Factor respiratorio nuclear 1.
Mn-SOD SOD dependiente de manganeso.	O₂⁻ Anión superóxido.
mRNA Ácido ribonucleico mensajero.	ob/ob Obeso.
NA Noradrenalina.	OH⁻ Radical hidroxilo.
NAD⁺ Nicotinamín adenín dinucleótido oxidado.	ONOO⁻ Peroxinitrito.
NADPH Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato.	PAM Presión arterial media
NIDDM Diabetes mellitus no insulino-dependiente.	PAS Presión arterial sistólica
NcoR Correpresor de receptor nuclear.	PBS Suero fisiológico salino.
	PC Peso corporal.

PCo

Peso cardíaco.

PDGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PDK4

Piruvato deshidrogenasa quinasa 4.

PGC

Coactivadoras de PPAR γ .

PGH₂

Prostaglandina H₂.

PGI₂

Prostaciclina.

PGs

Prostaglandinas.

PI3K

Fosfatidil inositol-3-quinasa.

PKC

Proteína quinasa C.

PLA₂

Fosfolipasa A₂.

PMA

Acetato de forbol miristato

PMSF

Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.

PPAR

Receptor para el activador de la proliferación de peroxisomas.

PR

Peso renal.

PPRE

Elemento de respuesta del PPAR.

PTK

Protein tirosin quinasa.

PTP

Protein tirosina fosfatasa.

PVDF

Fluoruro de polivinilideno.

PVI

Peso de ventrículo izquierdo.

RAGE

Receptor de AGE

RLU

Unidades relativas de luminiscencia.

RNA

Ácido ribonucleico.

ROS

Especies reactivas de oxígeno.

r.p.m.

Revoluciones por minuto.

RT-PCR

Transcriptasa inversa-reacción de la polimerasa en cadena.

RXR

Receptor del ácido 9-cis retinoico.

SAPK/JNK

Proteína cinasa activada por estrés/c-Jun N-terminal cinasa =JNK.

SDS

Dodecilsulfato sódico.

SEM

Error estándar de la media

Ser

Serina.

SMRT

Mediador del silenciamiento retinoide y del receptor de la hormona tiroidea.

SNC

Sistema nervioso central.

SOD

Superóxido dismutasa.

SRA

Sistema renina angiotensina.

SRC

Coactivador del receptor de esteroides.

STAT

Transductor de señales y activador de la transcripción.

STZ

Estreptozotocina.

TBS-T

Tampón Tris salino tamponado al 0.1% de Tween 20.

TG

Triglicéridos.

TGF- β

Factor de crecimiento transformante β .

TIMP

Inhibidor tisular de metaloproteasas de matriz.

TNF- α

Factor de necrosis tumoral α .

TFA

Tenoiltrifluoroacetona.

TXA₂

Tromboxano A₂.

UCP

Proteína desacopladora mitocondrial.

VC

Vasoconstricción.

VCAM-1

Molécula de adhesión de las células vasculares 1.

VD

Vasodilatación.

VEGF

Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VLDL

Lipoproteínas de muy baja densidad.

VP16

Proteína viral.

WKY

Wistar-Kyoto.

XO

Xantina oxidasa.

Índice.

Índice

Introducción.....	3
1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	3
1.1. La disfunción endotelial en diabetes mellitus en humanos.....	3
1.2. Mecanismo de daño en la vasodilatación dependiente de endotelio en diabetes.....	5
1.2.1. Vía de transducción de señal.....	6
1.2.2. Disponibilidad del sustrato.....	7
1.2.3. Destrucción incrementada de EDRF.....	7
1.2.4. EDCF.....	8
1.2.5. EDHF.....	8
1.2.6 Disminución de la capacidad de respuesta del músculo liso vascular a EDRF.....	9
2. MECANISMOS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN DIABETES MELLITUS Y RESISTENCIA A LA INSULINA.....	10
2.1. Alteración de la señalización de la insulina en células endoteliales.....	10
2.2. Incremento del estrés oxidativo.....	12

2.3. Activación proinflamatoria del endotelio.....	15
2.4. Activación de la Proteín Kinasa C.....	16
2.5. Disfunción mitocondrial.....	18
3. MODELO DE DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA.....	24
4. RECEPTORES ACTIVADOS POR EL PROLIFERADOR DE PEROXISOMAS.....	27
1.1. Receptores.....	27
1.1.1. Introducción.....	27
1.1.2. Características estructurales y mecanismo de acción.....	28
1.1.3. Co-activadores/represores de PPARs.....	30
1.1.4. Tipos de receptores PPAR.....	32
<i>a) PPARα</i>	33
<i>b) PPARγ</i>	34
<i>c) PPARβ</i>	36
1.2. Ligandos específicos PPAR β	36
1.3. Efectos de los PPAR β	39
1.3.1. PPAR β y el tejido adiposo.....	40
1.3.2. PPAR β y el músculo esquelético.....	42
1.3.3. PPAR β y el sistema cardiovascular.....	48

- Función cardíaca/miocitos.....	48
- PPAR β y células vasculares.....	51
1. Células endoteliales.....	51
2. Células músculo liso vascular.....	53
3. Fibroblastos.....	54
4. Macrófagos.....	54
- PPAR β y enfermedades cardiovasculares.....	55
a) Aterosclerosis.....	55
b) Isquemia /reperfusión.....	58
c) Hipertrofia cardíaca.....	59
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	61
MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
1. AGONISTAS PPARβ OBJETO DE ESTUDIO.....	65
2. EFECTOS DE LOS AGONISTAS PPARβ SOBRE LA ALTERACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR HIPERGLUCEMIA.....	66
2.1. Cultivo primario de células endoteliales.....	66
2.2. Transfección de PPAR β siRNA.....	67

2.3. Cuantificación de NO liberado por diaminofluoresceína-2 en HUVECs.....	68
2.4. Expresión proteica en HUVECs.....	69
2.5. Expresión de diferentes genes mediante PCR	72
2.6. Medida de la concentración de ROS intracelular	73
2.7. Reactivos.....	74
2.8. Análisis estadístico.....	74
3. EFECTOS DEL AGONISTA DE PPARβ, GW0742, SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL DE RATAS DIABÉTICAS TIPO 1.....	75
3.1. Animales y grupos experimentales.....	75
3.2 Medida de la presión arterial	77
3.3 Parámetros morfológicos.....	78
3.4. Determinaciones en plasma.....	79
3.4.1. Glucosa, triglicéridos, HDL y colesterol	79
3.4.2. Peroxidación lipídica	79
3.4.3. ET-1.....	80
3.5 Estudios de reactividad vascular	80
3.5.1. Aorta torácica	80
3.5.1.1. Montaje de la preparación	80
3.5.1.2. Protocolos experimentales ex vivo	81

3.5.2. Arteria mesentérica	82
3.5.2.1. Montaje de la preparación	82
3.5.2.2. Protocolos experimentales ex vivo	82
3.5.3. Experimento <i>in vitro</i> de reactividad vascular en aorta torácica	82
3.6 Detección <i>in situ</i> del contenido vascular de ROS.....	83
3.7. Actividad vascular de la NADPH oxidasa.....	84
3.8 Determinación de la actividad de la mieloperoxidasa.....	85
3.9. Ensayos inmunohistoquímicos.....	85
3.10 Expresión vascular de diferentes proteínas mediante Western Blot.....	86
3.11. Expresión de diferentes genes mediante PCR.....	88
3.12 Análisis estadístico.....	90
3.13. Reactivos.....	90
RESULTADOS.....	92
1. EFECTOS DE LOS AGONISTAS PPARβ, GW0742 Y L165041 SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN HUVECS EN CONDICIONES DE HIPERGLUCEMIA.....	92
1.1. Efecto de la alta glucosa sobre la producción de NO estimulado por insulina en HUVECs.....	92

1.2. La activación de PPAR β mejora el daño en la vía Akt-eNOS en condiciones de alta glucosa en respuesta a la insulina.....	94
1.3. Papel de la AMPK y la MAPK en el efecto protector de los agonistas PPAR β	100
1.4. Papel de los genes diana de PPAR β , CPT-1 y PDK-4 en el efecto protector de sus agonistas.....	103
1.5. Efectos de los agonistas PPAR β en la producción intracelular de ROS.....	105
1.6. Efectos de los PPAR β en la fosforilación de IRS-1.....	107
2. EFECTOS DEL AGONISTA PPARβ, GW0742, SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS DIABÉTICAS TIPO 1.....	108
2.1. Efectos de GW0742 sobre la presión arterial, variables morfológicas y determinaciones plasmáticas.....	108
2.2. Efectos de GW0742 sobre PPAR y genes diana de PPAR β en la aorta.....	110
2.3. GW0742 mejora la disfunción endotelial en ratas diabéticas.....	112
2.4. Papel de los factores relajantes derivados de endotelio en los efectos vasculares de GW0742.....	113
2.5. GW0742 reduce la producción de ROS vasculares en ratas diabéticas al reducir la actividad NAD(P)H oxidasa.....	117

2.6. Efectos de GW0742 sobre la infiltración de macrófagos.....	121
2.7. Efectos de GW0742 sobre la infiltración de macrófagos.....	122
2.8. Papel de PPAR β en la disfunción endotelial inducida por elevados niveles de glucosa <i>in vitro</i>	123
DISCUSIÓN	125
1. Efectos de los PPAR β sobre la disfunción endotelial inducida por hiperglucemia <i>in vitro</i>	125
2. La activación de PPAR β previene la disfunción endotelial en ratas diabéticas tipo 1.....	133
CONCLUSIONES	142
BIBLIOGRAFÍA	143

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1. Esquema de la alteración de la señalización de la insulina PI3K-Akt-eNOS-NO como una característica de resistencia a insulina.....23

Figura 2. Estructura química de Estreptozotocina.....24

Figura 3. Esquema representativo de los efectos tóxicos de la estreptozotocina en células β induciendo una diabetes química.....26

Figura 4. Esquema representativo de los dominios funcionales de PPARs y la similitud entre las isoformas.....29

Figura 5. Mecanismo de acción de PPARs.....32

Figura 6. Esquema de las acciones metabólicas de PPAR β47

Figura 7. Esquema de las acciones de PPAR β relacionadas con el metabolismo en tejido adiposo, músculo esquelético y corazón.....51

Figura 8. Disrupción en la señalización de insulina en cultivo primario de HUVECs en condiciones de alta glucosa.....93

Figura 9. Efecto de la producción de NO mediada por insulina en HUVECs expuestas a condiciones de baja glucosa.....94

Figura 10. Efecto de la producción de NO mediada por insulina en HUVECs expuestas a condiciones de alta glucosa.....95

Figura 11. Efectos de los agonistas PPAR β sobre el daño en la señalización de la insulina en cultivos primarios de HUVECs en condiciones de alta glucosa.....96

Figura 12. Efectos del siRNA específico de PPAR β98

Figura 13. Efectos de los agonistas selectivos de PPAR α , clofibrato, y PPAR γ , ciglitazona, sobre la producción de NO mediada por insulina en condiciones de hiperglucemia.....99

Figura 14. Papel de la AMPK y de la MAPK en el efecto protector de PPAR β102

Figura 15. Papel de los genes diana de PPAR β , CPT-1 y PDK-4 en el efecto protector de los agonistas PPAR β104

Figura 16. Efecto del agonista PPAR β en la producción intracelular de ROS.....106

Figura 17. Efectos de los agonistas PPAR β en la fosforilación de IRS-1.....	107
Figura 18. Efectos de GW0742 sobre PPAR y genes diana PPAR β en aorta.....	111
Figura 19. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial.....	114
Figura 20. Efectos de GW0742 sobre la vía del NO en aorta de rata.....	116
Figura 21. Efectos de GW0742 sobre la fosforilación de eNOS-Ser1177 o caveolina-1-Tyr-14 (Cav-1) en aorta de rata de todos los grupos experimentales.....	117
Figura 22. Efectos de GW0742 en la producción de ROS.....	119
Figura 23. <i>Efectos de GW0742 en la vía de la NAD(P)H oxidasa.....</i>	120
Figura 24. Efectos de GW0742 sobre la infiltración de macrófagos en la aorta.....	121
Figura 25. Efectos de GW0742 sobre la expresión de mRNA de ppET-1.....	122

Figura 26. Efectos de GW0742 sobre la disfunción endotelial inducida por alta glucosa en anillos de aorta in vitro.....124

Figura 27. Esquema propuesto de la activación de PPAR β sobre la mejora de la alteración de la señal de insulina inducida por hiperglucemia en células endoteliales132

Figura 28. Mecanismo propuesto del efecto beneficioso sobre la disfunción endotelial del agonista PPAR β , GW0742 en aorta de ratas diabéticas tipo 1.....141

Tablas

Tabla 1. Ligandos de PPAR β38

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en las determinaciones de expresión proteica.....87

Tabla 3. Secuencia de primers.....89

Tabla 4. Presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca y determinaciones plasmáticas en todos los grupos experimentales...109

Tabla 5. Peso corporal y de los órganos e índices cardíaco y renal..110

Introducción.

Introducción

1. Definición y concepto de disfunción endotelial

La disfunción endotelial puede definirse como el desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales vasodilatadores (VD) y el de las sustancias vasoconstrictoras (VC) que pueden sintetizarse en las células de este tejido. Este desequilibrio se manifiesta con una reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio o con una mayor respuesta vasoconstrictora. Hay que tener en cuenta, no obstante, que cuando existe un deterioro endotelial pueden además afectarse otras funciones de este tejido y puede facilitarse la interacción de las plaquetas y los leucocitos con la pared vascular, así como el crecimiento y la migración de las CMVL (Endemann y Schiffrin, 2004). Por tanto, en una definición más amplia de disfunción endotelial se incluiría, no sólo una capacidad vasodilatadora disminuida, sino también un estado proinflamatorio y protrombótico asociado a la misma.

1.1. La disfunción endotelial en diabetes mellitus en humanos.

Numerosos estudios relacionan la disfunción endotelial con la DM humana. Estudios transversales muestran una vasodilatación dependiente de endotelio reducida en arterias coronarias y periféricas de pacientes con DM tipo 1 y tipo 2. La disfunción endotelial también se observa en estados asociados con la DM tipo 2, como la obesidad, la vida sedentaria y el síndrome metabólico.

Además de la alteración en la función vasodilatadora, la diabetes se asocia con niveles circulantes elevados de moléculas de adhesión y el inhibidor activador de plasminógeno-1 (PAI-1, *Plasminogen Activity Inhibitor-1*) (Keaney *et al.*, 2004; Meigs *et al.*, 2000; de Jhogh *et al.*, 2004), reflejando un fenotipo endotelial

proinflamatorio y protrombótico. Aunque la etiología de la disfunción vascular en diabetes ha sido ampliamente investigada en humanos y en modelos de animales diabéticos, aún no está claro el mecanismo primario que relaciona la diabetes con la enfermedad vascular.

De manera similar, la alteración en la dilatación mediada por flujo (Rossi *et al.*, 2005) y el polimorfismo de la eNOS son predictores multivariantes de incidencia de DM tipo 2 (Monti *et al.*, 2003). La prevalencia de disfunción endotelial previa al desarrollo de DM tipo 2 sugiere que hay mecanismos fisiopatológicos comunes que relacionan la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial.

Ensayos clínicos adicionales demuestran que existe una relación entre la disfunción endotelial y resistencia a la insulina, dado que se ha observado una mejora de la función endotelial seguida de tratamientos que mejoran la resistencia a la insulina. Por ejemplo, rosiglitazona (Pistrosch *et al.*, 2004) y troglitazona (Caballero *et al.*, 2003) mejoran la función endotelial en la microvasculatura del antebrazo de pacientes con DM tipo 2. La metformina mejora la dilatación dependiente de endotelio en pacientes con DM tipo 2 (Mather *et al.*, 2001) y en pacientes con síndrome metabólico (de Aguiar *et al.*, 2006), pioglitazona mejora la función endotelial en pacientes no diabéticos con hipertensión o hipercolesterolemia con o sin resistencia a la insulina basal (Campia *et al.*, 2006), y rosiglitazona mejora la dilatación mediada por flujo y disminuye los marcadores de inflamación en sujetos sanos, sin obesidad, factores de riesgo, o historia familiar de diabetes (Hetzl *et al.*, 2005). Intervenciones menos específicas asociadas con una mejora a la sensibilidad a la insulina y/o disminución de riesgo de DM incluyendo pérdida de peso, ejercicio, e inhibidores del sistema renina-angiotensina también mejoran la función endotelial (Hamdy *et al.*, 2003; Gokce *et al.*, 2005; Cheetham *et al.*, 2000; O'Driscoll *et al.*, 1999).

Sobre todo, está claro que la DM en humanos está asociada con alteraciones de la función endotelial, lo cual puede explicar, en parte, el incrementado riesgo de enfermedad vascular en pacientes diabéticos.

1.2. Mecanismo de daño en la vasodilatación dependiente de endotelio en diabetes.

La alteración en la vasodilatación dependiente de endotelio puede presentarse por varios mecanismos: reducción en la producción de uno de los factores relajantes derivados de endotelio (EDRFs, *endothelium-derived relaxing factors*), aumento de la inactivación de EDRF, una menor difusión del EDRF a las células subyacentes del músculo liso, disminución de la capacidad de respuesta del músculo liso al EDRF y aumento en la generación de factores constrictores derivados de endotelio (EDCF, *endothelium-derived constricting factors*) (An S. De Vriese, 2000). Para cada uno de estos mecanismos, se han presentado tanto evidencias negativas como a favor. Las diferencias en el modelo de diabetes, la duración o gravedad de la diabetes indudablemente desempeñan un papel en alguna de las discrepancias, el tipo de circulación, el calibre del vaso y las condiciones de estudio pueden ser una fuente mucho más importante de disparidad. Un ejemplo ilustrativo de estas discrepancias es que se ha descrito la existencia de daño de la vasodilatación dependiente de endotelio *in vivo* en la circulación mesentérica o en arterias mesentéricas aisladas perfundidas de ratas diabéticas, y la ausencia en aorta aislada en los mismos animales (Fortes *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1994b). Las células endoteliales de diferentes lechos vasculares exhiben diferencias estructurales y metabólicas de tal forma que pueden ser afectadas de manera diferente en condiciones de hiperglucemia (Sobrevia y Mann, 1997). Los mecanismos vasodilatadores dependientes de endotelio pueden ser distintos, dependiendo de la preparación vascular a estudiar. Aunque el NO ha sido considerado generalmente como el principal mediador de relajación dependiente de endotelio, el EDHF puede también ser un regulador importante del tono y la reactividad vascular, especialmente en pequeños vasos de resistencia (Féletou y Vanhoutte, 1999).

Varios estudios han demostrado un gradiente en la liberación de EDRFs, con una creciente contribución de EDHF en los vasos más distales. La identificación

de EDHF ha sido objeto de persistente controversia. Es probable que exista más de un EDHF, con una importante heterogeneidad en la especie y la región vascular (Mambouli y Vanhoutte, 1997). Por lo tanto, la relativa contribución y la naturaleza de los mecanismos vasodilatadores independientes de NO pueden generar algunas discrepancias observadas entre los estudios.

La mayoría de las investigaciones se han centrado en el estudio de arterias de gran conductancia. Investigaciones más recientes se dirigen al estudio de vasos de resistencia, de mayor importancia en el control del flujo sanguíneo local. Los estudios de órganos aislados perfundidos, aunque escasos, aportan información adicional, ya que la resistencia y reactividad vascular se determinan en la totalidad de los vasos, incluyendo las arteriolas más pequeñas. Finalmente, aunque los estudios *in vivo* tienen limitaciones en cuanto a la toxicidad de ciertas intervenciones farmacológicas, permiten el estudio de la función endotelial bajo condiciones de flujo fisiológicas y en presencia de diabetes. Por lo tanto es imprescindible tener en cuenta todos los tipos de condiciones experimentales antes de llegar a conclusiones sólidas.

1.2.1. Vía de transducción de señal.

En la retina de ratas diabéticas se ha observado una reducción de la expresión así como modificaciones estructurales de las proteínas G (Sobrevia y Ma nn, 1997). Se ha descrito una disminución en la relajación inducida a ACh, sin modificarse la respuesta normal a bradiquinina, en vasos de resistencia aislados de pacientes con diabetes tipo 1 (McNally *et al.*, 1994), y en arterias mesentéricas de ratas STZ (Lash y Bohlen, 1991; Taylor *et al.*, 1995), sugiriéndose una alteración a nivel de proteína G. Sin embargo, otros estudios describen una alteración similar en la respuesta dependiente de endotelio a diferentes agonistas (Heygate *et al.*, 1995; Fulton *et al.*, 1996; Costa e Forti y Fonteles, 1998; Mayhan y Patel, 1995; 1998; Mayhan, 1997) o disminución en la relajación al ionóforo de calcio A23187 (Oyama *et al.*, 1986; Durante *et al.*, 1998; Cameron y Cotter, 1992; Fukao *et al.*,

1997) haciendo que la alteración en los receptores o los mecanismos acoplados al receptor sean un mecanismo común de disfunción endotelial.

1.2.2. Disponibilidad del sustrato.

A pesar de que el suplemento de L-arginina no es un factor limitante de velocidad para la síntesis de NO en condiciones normales, la biodisponibilidad reducida, la alteración en el transporte o el metabolismo de la L-arginina podrían ser un mecanismo de disfunción endotelial en vasos diabéticos. En ratas diabéticas se ha observado una reducción marcada de niveles de arginina en suero (Pieper y Peltier, 1995; Rösen *et al.*, 1996; Angulo *et al.*, 1998) que ha sido atribuida a un aumento en el consumo de L-arginina debido a un incremento en la síntesis de NO. De acuerdo con esto, la actividad de la eNOS, medida por la conversión de $^3\text{H-L-arginina}$ a $^3\text{H-L-citrulina}$, se encuentra incrementada en el endotelio del corazón de ratas diabéticas (Rösen *et al.*, 1996). La L-arginina exógena restauró parcialmente la vasodilatación dependiente de endotelio (Pieper y Peltier, 1995; Fulton *et al.*, 1996; Matsunaga *et al.*, 1996; Angulo *et al.*, 1998), pero no en todos los estudios (Heygate *et al.*, 1995; Koltai *et al.*, 1997; Mayhan *et al.*, 1997). Esta variabilidad en los resultados puede estar relacionada con un efecto inespecífico de la L-arginina; se sabe que este aminoácido libera insulina, la cual por sí misma puede estimular la vasodilatación dependiente de endotelio (MacAllister *et al.*, 1995).

1.2.3. Destrucción incrementada de EDRF.

Gran parte de la atención se ha centrado en la vasodilatación dependiente de endotelio. Sin embargo, una relajación más transitoria ha sido descrita en aortas de ratas diabéticas, a pesar de que el grado de relajación era normal (Hattori *et al.*, 1991). La SOD restauró la duración de la relajación de las aortas, sugiriendo una inactivación de EDRF por radicales libres derivados de oxígeno. En un

experimento con EDRF, la perfusión de la aorta diabética produjo menos relajación, en comparación con la aorta control. La infusión de SOD en un sitio proximal al segmento donador normalizó las relajaciones, lo que sugiere que niveles similares de EDRF son liberados por la aorta diabética, pero su acción es atenuada por las especies reactivas de oxígeno (Pieper *et al.*, 1992).

1.2.4. EDCF.

Varios estudios implican una sobreproducción de vasoconstrictores derivados de endotelio, principalmente prostanoides, en la fisiopatología de la disfunción endotelial, por ejemplo en las arteriolas de la piamadre de ratas diabéticas *in vivo* y en aorta aisladas de estas ratas diabéticas (Shimizu *et al.*, 1993; Tesfamariam *et al.*, 1989). Estos EDCFs se cree que son liberados junto con EDRFs y se oponen sus efectos sobre las células del músculo liso. Las alteraciones en las relajaciones son restauradas por bloqueantes no específicos de la ciclooxigenasa y antagonistas de receptores de prostanoides TP, pero no por bloqueantes de la síntesis de tromboxano A₂, sugiriendo que el responsable es una prostanglandina-endoperóxido (Tesfamariam *et al.*, 1989; 1990; Mayhan *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1993). Por otro lado, la inhibición de ciclooxigenasa no restauró la alteración en la relajación dependiente de endotelio en arterias mesentéricas aisladas (Taylor *et al.*, 1992; Diederich *et al.*, 1994; Fukao *et al.*, 1997), y en riñón y corazón aislados y perfundidos (Quilley *et al.*, 1996; Fulton *et al.*, 1996) y en la microcirculación renal *in vivo* (De Vriese *et al.*, 1999), indicando que los prostanoides vasoactivos no juegan un papel importante en la disfunción endotelial de estos lechos vasculares.

1.2.5. EDHF.

Pocos estudios se han centrado en la contribución de los EDHF en la disfunción endotelial en la diabetes. En ausencia de inhibidores específicos de

EDHF, la mayor parte de la evidencia actual es inevitablemente indirecta. La disminución de la hiperpolarización inducida por ACh y la relajación resistente a la inhibición de la eNOS y a la ciclooxigenasa fue observada en arterias mesentéricas. En el corazón perfundido de Langendorff (Quilley *et al.*, 1996), en perfundido de riñón (Fulton *et al.*, 1996) así como también la microcirculación renal *in vivo* (De Vriese *et al.*, 1999), la vasodilatación independiente de eNOS y COX, de bradiquinina o ACh estuvo profundamente alterada. Otros autores han observado un déficit más pronunciado de las relajaciones inducidas por ACh en presencia de inhibidores de eNOS y ciclooxigenasa en arterias mesentéricas (Taylor *et al.*, 1992) o a una disminución en la relajación inducida a ACh resistente a la inhibición de NOS en arterias renales aisladas de ratas diabéticas (Dai *et al.*, 1993), sin estar esto relacionado con los resultados debidos a una alteración de EDHF. En aorta de rata aislada, no se encontraron pruebas de una contribución disminuida de relajaciones dependientes de endotelio a EDHF (Endo *et al.*, 1995). Puesto que la contribución de EDHF es mayor en vasos de menor calibre, no es de sorprender la evidencia de un papel de EDHF en la disfunción endotelial en diabetes esté restringida a arterias de resistencia.

1.2.6. Disminución de la capacidad de respuesta del músculo liso vascular a EDRF.

La gran mayoría de los estudios muestran una vasodilatación alterada a agonistas dependientes de endotelio sin que se vea modificada la respuesta a vasodilatadores independientes de endotelio. Ésto sugiere que el estado diabético no conlleva a una reducción generalizada en la sensibilidad del músculo a EDRF, al menos no inicialmente. En uno de los pocos estudios experimentales en donde una disminución de la respuesta a nitrovasodilatadores fue observada, fue precedida por una respuesta a ACh alterada (Dai *et al.*, 1993). Una respuesta alterada a nitrovasodilatadores fue más frecuentemente encontrada en humanos (McVeigh *et al.*, 1992; Calver *et al.*, 1992; Zenere *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1996;

Clarkson *et al.*, 1996; Lekakis *et al.*, 1997), quizás debido al estado más avanzado de la diabetes. En apoyo a esta afirmación, la dilatación con el dinitrato de isosorbide estuvo reducida en microalbuminuria, pero no en pacientes con normoalbuminuria (Lekakis *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que distintos mecanismos pueden mediar la alteración en la respuesta a agonistas independientes de endotelio.

Curiosamente, una disminución selectiva en la respuesta vasodilatadora a agonistas de canales de K^+ sensibles a ATP ha sido descrita por varios autores (Cameron y Cotter, 1992; Mayhan y Faraci, 1993; Crijs *et al.*, 1998).

2. Mecanismos de disfunción endotelial en diabetes mellitus y resistencia a la insulina.

2.1. Alteración de la señalización de la insulina en células endoteliales.

Un mecanismo importante de disfunción endotelial en la diabetes mellitus es la alteración de las rutas de señalización de activación de la eNOS en el endotelio.

La relevancia de la disfunción endotelial en la diabetes, radica en que la insulina por sí misma es un importante estímulo para la activación de la eNOS. La unión de la insulina a su receptor presente en las células endoteliales lleva a la fosforilación del IRS-1 y subsecuentemente a la fosforilación y activación de la eNOS vía PI3K/Akt (Kim *et al.*, 2006; Muniyappa *et al.*, 2007). Este mecanismo está respaldado por estudios que demuestran que la producción de NO estimulada por insulina es bloqueada por inhibidores tanto de PI3K como de Akt (Montagnani *et al.*, 2001; Hartell *et al.*, 2005). Además, mutaciones en el sustrato de receptor de insulina (IRS-1, *Insulin Receptor Substrate-1*) disminuyen la fosforilación de eNOS estimulada por insulina y su expresión génica en células endoteliales (Esquema 1).

Por otro lado, se ha descrito que en ratones deficientes en receptores de insulina a nivel endotelial presentan una menor expresión de eNOS y una disminución de la función vasodilatadora endotelial. En modelos animales de resistencia a la insulina, como las ratas Zucker obesas, se observan alteraciones en el sistema PI3K/Akt y una menor biodisponibilidad de NO.

La insulina activa otras rutas de señalización celular, además de la vía PI3K/Akt, como por ejemplo la vía proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) vía GTPasa Ras (Nacci *et al.*, 2009). La activación de la vía MAPK/Ras se relaciona principalmente a un estado proliferativo. La activación de esta vía de señalización en células endoteliales ha sido relacionada con la expresión de ET-1, potente vasoconstrictor y mitógeno, y con la expresión de moléculas de adhesión proinflamatorias tales como la molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1, *InterCellular Adhesion Molecule-1*). (Wheatcroft *et al.*, 2003). En el caso de la diabetes y la resistencia a la insulina, la activación de la eNOS mediada por insulina vía PI3K/Akt está inhibida, mientras que los efectos adversos de la insulina no son contrarrestados, lo que podría promover la aparición de enfermedad vascular (Wheatcroft *et al.*, 2003; Montagnani *et al.*, 2002). Estímulos fisiológicos y el flujo sanguíneo activan la eNOS vía PI3K/Akt por lo que una alteración de este mecanismo de acción en diabetes podría jugar un papel importante en la aparición de la disfunción vascular.

Además, estudios en humanos corroboran la importancia de la alteración de la vía de señalización de la insulina en la disfunción endotelial.

En sujetos sanos, la infusión de insulina estimula los vasos e incrementa el flujo sanguíneo en tejidos periféricos, y este efecto se encuentra reducido en pacientes con DM y resistencia a la insulina. Se sugiere que las acciones de la insulina en tejidos y la vasculatura están estrechamente relacionadas y que una alteración en la capacidad vasodilatadora en respuesta a la insulina podría contribuir a una modificación del metabolismo de la glucosa.

La fosforilación de la Akt y la expresión de la eNOS estaban alteradas en el tejido arterial recolectado de pacientes diabéticos en el momento de la cirugía de bypass coronaria (Okon *et al.*, 2005). Como se ha observado en sistemas experimentales, la infusión de insulina incrementa los niveles circulantes de ET-1 en humanos, una respuesta que podría estar incrementada en la resistencia a la insulina (Piatti *et al.*, 1996). Por consiguiente, la alteración selectiva de la señalización de PI3K/Akt caracteriza la resistencia a la insulina y puede contribuir a la disfunción endotelial y enfermedad vascular en diabetes mellitus tipo 2 (Wheatcroft *et al.*, 2003).

La diabetes mellitus altera otros numerosos mecanismos relacionados con la activación de la eNOS. La diabetes y la obesidad están asociadas con un incremento en la expresión de caveolina-1, un regulador negativo de la eNOS, en el endotelio de animales de experimentación (Lam *et al.*, 2006; Bucci *et al.*, 2004), y en el tejido adiposo de pacientes diabéticos (Catalan *et al.*, 2008). Esto está asociado con daños en la activación de eNOS y daño en la función vasodilatadora. Así mismo, como se ha mencionado previamente la diabetes está asociada con niveles incrementados de inhibidores endógenos de eNOS como la dimetil-arginina asimétrica (ADMA, *asymmetric-dimethyl-L-arginine*) (Boger 2003), por lo que se puede afirmar que la diabetes tiene múltiples efectos sobre la señalización celular y la actividad enzimática, lo que resulta en una incapacidad para producir NO en respuesta a estímulos fisiológicos.

2.2. Incremento del estrés oxidativo.

El incremento de estrés oxidativo en la vasculatura es otro de los mecanismos responsables de la aparición de disfunción endotelial en diabetes. Concentraciones elevadas de glucosa o ácidos grasos libres inducen la producción de superóxido y alteran la biodisponibilidad de NO en la pared vascular, mientras que el tratamiento antioxidante restauró la función endotelial en estas condiciones (Teshfamariam y Cohen, 1992; Davda *et al.*, 1995). El aumento del estrés oxidativo

tiene la capacidad de disminuir la biodisponibilidad de NO a través de varios mecanismos (Stocker y Keaney, 2004; Tomasian *et al.*, 2000). En primer lugar, el anión superóxido puede reaccionar con el NO para formar peroxinitrito (ONOO⁻) y eliminar la actividad biológica del NO. El ONOO⁻ es un agente altamente oxidante que puede modificar la función de una gran cantidad de enzimas celulares (Beckman y Koppenol, 1996). En particular, el ONOO⁻ puede alterar la actividad catalítica de la eNOS en células endoteliales y de guanilil ciclasa en células musculares lisas vasculares. Como resultado de esta acción el ONOO⁻ reduce la producción de NO y su capacidad de respuesta en los tejidos diana (Zou *et al.*, 2002; Munzel *et al.*, 2005). La producción incrementada de ROS puede también influir en el estado redox de cofactores críticos de la eNOS, incluyendo tetrahidrobiopterina (BH₄, *tetrahydrobiopterin*). La pérdida de BH₄ desacopla la eNOS y promueve la producción de superóxido, en lugar de NO (Guzik *et al.*, 2002). Las ROS pueden aumentar los productos de peroxidación lipídica que interfieren con la activación dependiente de receptor de eNOS, inactivar NO, y disminuir la capacidad de respuesta de los tejidos diana (Hamburg y Vita, 2006; Tong *et al.*, 2009).

Numerosas fuentes enzimáticas de superóxido han sido identificadas en la vasculatura diabética. La NADPH oxidasa es un multicomplejo enzimático asociado a membrana que genera anión superóxido (O₂⁻) y está implicada en el estrés oxidativo en las células endoteliales tanto en condiciones anormales como en inflamación (Stocker y Keaney, 2004). En condiciones patológicas, incluyendo la diabetes mellitus, la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de superóxido está incrementada (San Martín *et al.*, 2007; Gao y Mann, 2009). El aumento de la concentración de ácidos grasos libres activa la NADPH oxidasa y promueve la activación del factor de transcripción proinflamatorio NFκB (*Nuclear Factor-κB*) (Maloney *et al.*, 2009). La expresión de NADPH oxidasa está también regulada a la alza por la angiotensina II (Ang II) (Rajagopalan y Harrison, 1996), y es interesante como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

tienen efectos vasculares beneficiosos en la diabetes (Henriksen, 2007; Oak y Cai, 2007).

La eNOS desacoplada es otra fuente importante de estrés oxidativo en la vasculatura diabética. En condiciones fisiológicas, la eNOS se presentan en forma de dímero y sintetiza NO, sin embargo, la enzima reduce el oxígeno a O_2^- cuando hay una disminución de la disponibilidad del cofactor BH_4 (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998). La diabetes está asociada con el desacoplamiento de la eNOS y la disminución de los niveles de BH_4 . Cuando la BH_4 es oxidada, se genera un ciclo mediante el cual el estrés oxidativo conlleva a un desacoplamiento de la eNOS y un incremento en la producción de anión superóxido, que a su vez puede reducir la disponibilidad de la BH_4 , y promover aún más el estrés oxidativo. De acuerdo con este mecanismo, la suplementación de BH_4 mejora la producción de NO y la función endotelial en modelos animales experimentales (Pieper, 1997; Alp *et al.*, 2003) y en humanos con DM tipo 2 (Heitzer *et al.*, 2000). Otras fuentes de ROS han sido identificadas. Por ejemplo, la hiperglucemia y la diabetes están asociadas con una producción incrementada de O_2^- por el sistema aldosa reductasa y, componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Brownlee, 2001).

Estudios en seres humanos avalan la importancia del estrés oxidativo como mecanismo de disfunción endotelial en la DM y en la resistencia a la insulina. Por ejemplo, marcadores circulantes de estrés oxidativo, como isoprostanos F2 y anticuerpos contra la lipoproteína de baja densidad oxidada, están incrementados en humanos con diabetes, obesidad y resistencia a la insulina (Meigs *et al.*, 2007; Keaney *et al.*, 2003). Estudios clínicos han demostrado una mejoría en la función endotelial con tratamiento antioxidante. En este sentido, la infusión de ácido ascórbico en concentraciones suficientemente elevadas para actuar como “scavenger” de O_2^- , mejora la función endotelial en el antebrazo de pacientes con DM (Ting *et al.*, 1996). El tratamiento con alfa-tocoferol mejoró la función endotelial en las arterias coronarias de pacientes con DM tipo 1, sin presentar efecto beneficioso en pacientes con DM tipo 2 (Beckman *et al.*, 2003).

Aunque el estrés oxidativo es un mecanismo principal y los agentes antioxidantes pueden mejorar la función endotelial en ciertas situaciones, los resultados clínicos del tratamiento con alfa-tocoferol a gran escala no han podido demostrar un efecto beneficioso (Lonn *et al.*, 2002; MRC/BHF, 2002). Estos resultados pueden tener importantes implicaciones en la prevención y mantenimiento de la enfermedad vascular en diabetes mellitus. Una estrategia diseñada para inhibir fuentes enzimáticas de especies reactivas del oxígeno probablemente origine un mayor beneficio que el tratamiento con captadores de especies reactivas del oxígeno tales como ácido ascórbico, alfa-tocoferol, y otros compuestos antioxidantes. De acuerdo con esto, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de receptores de angiotensina limitan la expresión de NADPH oxidasa inducida por Ang II y disminuyen la producción de O_2^- en el endotelio (Münzel *et al.*, 2001). Estos fármacos han demostrado mejorar la disfunción endotelial y reducir el riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes mellitus (Yusuf *et al.*, 2000)

2.3. Activación proinflamatoria del endotelio.

La diabetes se asocia con un estado inflamatorio sistémico que puede conducir a una alteración en la función endotelial y favorecer la aparición de aterosclerosis. Pacientes con diabetes mellitus u obesidad presentan niveles circulantes incrementados de marcadores inflamatorios, entre los que destacan la proteína C reactiva, el TNF- α , la IL-6, e ICAM-1 (Keaney *et al.*, 2004; Festa *et al.*, 2000; Dandona *et al.*, 1998; Vozarova *et al.*, 2001). Además, un incremento en los marcadores inflamatorios aumenta el riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos (Schulze *et al.*, 2004). Así mismo, este incremento en los marcadores inflamatorios circulantes también está relacionado con una mayor incidencia de aparición de diabetes (Meigs *et al.*, 2004; Pradham *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1999; Duncan *et al.*, 2003).

El factor de transcripción NFκB es un regulador clave de activación endotelial y, además, ha sido relacionado con la patogénesis de resistencia a la insulina (Shoelson *et al.*, 2006; Read *et al.*, 1994). El NFκB es activado por ácidos grasos libres, citoquinas inflamatorias, y el receptor de productos finales de la glicación avanzada (RAGE, *receptors of AGEs*) (Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2001; Bierhaus *et al.*, 1997; Bierhaus *et al.*, 2001). La activación de NFκB y posterior degradación de su subunidad inhibitoria IκB por la IκB kinasa (IKK-β), permite la translocación de las subunidades reguladoras p50 y p65 al núcleo, donde promueven la expresión de genes inflamatorios. En el músculo esquelético, TNF-α o la sobreexpresión de IKK-β produce resistencia a la insulina (de Alvaro *et al.*, 2004). De manera inversa, la supresión génica o la inhibición farmacológica de IKK-β por salicilatos previenen la resistencia a la insulina (Shoelson *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2001). Estudios realizados en cultivos de células endoteliales y en animales de experimentación sustentan la relación entre la activación de NFκB, desarrollo de un fenotipo inflamatorio, resistencia a la insulina, y la alteración en la bioactividad de NO (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008).

Recientes estudios en humanos sostienen la importancia clínica de estos mecanismos. El tratamiento de la obesidad en humanos con salsalato mejora la sensibilidad a la insulina y disminuye los marcadores circulantes de inflamación (Fleischman *et al.*, 2008). La expresión incrementada de p65 y disminución de IκB, ha sido observada en células endoteliales aisladas de individuos longevos y obesos, provocando la activación de NFκB, resultados que se relacionan con la alteración en la vasodilatación dependiente de endotelio (Donato *et al.*, 2007; Donato *et al.*, 2008). El tratamiento con salsalato de sujetos obesos redujo la activación de NFκB en células endoteliales (Pierce *et al.*, 2009). Este efecto estuvo asociado con una mejora de la sensibilidad a la insulina y vasodilatación dependiente de endotelio (Pierce *et al.*, 2009). Estos estudios plantean la posibilidad de que el tratamiento de la diabetes con salsalato u otros fármacos anti-inflamatorios podrían mejorar el control de la glucosa y disminuir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

2.4. Activación de la Proteín Kinasa C.

La PKC es una familia de serinas/treoninas quinasa que regulan procesos celulares incluyendo la activación y disfunción de células endoteliales. Las células mamíferas expresan múltiples isoformas de la PKC divididas en tres subfamilias: PKCs convencionales o clásicas (PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ), PKCs nuevas (PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ , PKC μ), y PKCs atípicas (PKC ζ , PKC λ / ι) (Geraldés y King, 2010; Reyland *et al.*, 2009).

En condiciones de hiperglucemia la PKC puede ser activada a través de dos vías: 1) La producción de superóxido mitocondrial inducido por la hiperglucemia induce la activación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa lo que provoca la modificación e inactivación de GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) por polímeros de ADP ribosa. La inactivación de la GAPDH resulta en la acumulación de intermediarios de glucólisis, el gliceraldeído-3-fosfato, el cual puede ser convertido a diacilgliceroles (DAG, *Dyacylglycerol*) promoviendo la activación de PKCs clásicas y novedosas. 2) La unión de los productos finales de la glicación avanzada (AGEs, *Advanced glycation end products*) a sus receptores RAGE también estimula la activación de la PKC aunque por mecanismos aún desconocidos (Thallas *et al.*, 2008).

La hiperglucemia da lugar a la disminución dependiente de PKC de la expresión de eNOS y de la generación de NO en células endoteliales de aorta y retina (Chakravarthy *et al.*, 1998; Cosentino *et al.*, 2003). Se ha visto que el activador de PKC, PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), aumenta la producción de ROS vía NADPH oxidasa y a su vez la inhibición de PKC limita la síntesis de ROS inducida por hiperglucemia en células endoteliales; por lo que se sugiere que la PKC reduce los niveles de NO por un efecto scavenger dependiente de ROS (Inoguchi *et al.*, 2000)

La PKC β es una isoforma importante en células endoteliales y es activada por DAG en condiciones de concentraciones elevadas de glucosa y ácidos grasos (Inoguchi *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1994).

La activación de la isoforma PKC β podría explicar la relación que existe entre inflamación, disfunción endotelial y resistencia a la insulina en diabetes mellitus (Das y King 2007; He y King 2004). La PKC β inhibe la PI3K y Akt resultando en la disminución de la fosforilación de eNOS. PKC β también activa al factor NF κ B (Rask-Madsen y King, 2005; Itani *et al.*, 2002). Así mismo cabe destacar que la inhibición de la PKC β mejora la biodisponibilidad de NO, y reduce la activación inflamatoria del endotelio en modelos experimentales (Naruse *et al.*, 2006; Cotter *et al.*, 2001; Hink *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 1996; Kouroedov *et al.*, 2004).

Tanto la estaurosporina como la calfofistina, inhibidores de las isoformas clásicas y nuevas de la PKC respectivamente, bloquean la activación del NF κ B inducida por hiperglucemia (Morigi *et al.*, 1998; Pieper y Riaz, 1997). Un inhibidor específico de la PKC β (ruboxistaurin) es capaz de prevenir la expresión de ICAM-1 inducida por AGEs y la adhesión leucocitaria en células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVECs, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) (Xu *et al.*, 2010). De igual forma, otro inhibidor de la PKC β , LY379196 previene la activación del NF κ B inducida por hiperglucemia (Kouroedov *et al.*, 2004), la expresión de molécula-1 de adhesión vascular (VCAM-1, *Vascular Cellular Adhesion Molecule-1*), (Kouroedov *et al.*, 2004) y la apoptosis (Quagliaro *et al.*, 2003), sugiriendo que la PKC β puede ser una diana importante para limitar la activación endotelial asociada a diabetes *in vivo*.

En humanos se ha descrito que el tratamiento con un inhibidor de PKC β previene el desarrollo de disfunción endotelial tras la infusión de glucosa en el antebrazo de voluntarios sanos (Beckman *et al.*, 2002) y mejora la dilatación por flujo arterial braquial en pacientes con DM. Además, se ha demostrado que en ratas diabéticas inhibidores de PKC β previenen las complicaciones renales y de retina y mejoran la vasodilatación aórtica inducida por ACh (Ishii *et al.*, 1996; Nangle *et al.*, 2003).

2.5. Disfunción mitocondrial.

En la cadena de transporte de electrones participan una serie de enzimas redox que reducen el oxígeno a agua, la función principal de la cadena transportadora de electrones es generar ATP, aunque presenta otras funciones celulares incluyendo un papel en la vía de señalización de producción de superóxido (Turrens, 2003). El principal consumo de O_2 por la mitocondria se relaciona con la síntesis de ATP, 1-2% es convertido en anión superóxido en condiciones fisiológicas (Chance *et al.*, 1979). Las ROS derivadas de la mitocondria están involucradas en el crecimiento, diferenciación y muerte celular programada (Duchen, 2004; Darley-Usmar V, 2004; Ramachandran *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2004; Green y Kroemer, 2004; Chen *et al.*, 2004; Quintero *et al.*, 2006). Niveles incrementados de ROS presentan efectos patológicos en la diabetes.

Las fuentes principales de generación de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial son los complejos I y III. El complejo III, parece ser responsable de la generación de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial principalmente en el corazón y en el pulmón, mientras que el complejo I es la fuente principal de generación de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial en el cerebro (Turrens, 2003). El complejo IV (citocromo oxidasa) cataliza la reducción de oxígeno a agua, donde el O_2 actúa como intermediario de la reacción.

Los sistemas de defensa antioxidantes mitocondriales protegen contra los efectos de deterioro de las especies ROS formadas dentro de la mitocondria. Dentro del espacio intermembrana de la mitocondria se encuentra la forma citosólica de la superóxido dismutasa (Cu, Zn-SOD), que cataliza la reducción del superóxido a peróxido de hidrógeno (Turrens, 2007). La expresión de la forma soluble de la enzima es regulada a la baja en condiciones de hiperglucemia (Ding *et al.*, 2007). También se encuentra dentro del espacio intracelular el citocromo C, el cual puede oxidar el superóxido a oxígeno. La superóxido dismutasa (Mn-SOD), la cual está localizada en la matriz mitocondrial, es un sistema antioxidante efectivo durante períodos de estrés oxidativo crónico (Turrens, 2007). La

mitocondria también contiene distintas peroxidasas, las cuales reducen los peróxidos tóxicos. Dentro de este grupo, la glutathion peroxidasa cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua usando el glutathion reducido como un donador de hidrógeno. La subsecuente reducción de glutathion oxidado se cataliza por la glutathion reductasa. Además de las enzimas antioxidantes, la mitocondria también contiene antioxidantes no enzimáticos, los más importantes incluyen vitamina E, coenzima Q, ácido lipóico y glutathion (Evans *et al.*, 2002; Rolo y Palmeira, 2006).

Ha sido demostrado que la hiperglucemia promueve reacciones dependientes de ROS, tales como la glicación y la inactivación parcial del complejo III (Rosca *et al.*, 2005), así como también la regulación a la baja de la codificación de genes de proteínas del complejo III (Palmeira *et al.*, 2007). Sin embargo, la sobreexpresión de la SOD mitocondrial protege a las células endoteliales del daño oxidativo inducido por diabetes (Du *et al.*, 2000; Kowluru *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2007).

La formación de nuevas mitocondrias (biogénesis) está regulada por coactivador-1 (PGC-1 α) del PPAR γ y el factor respiratorio nuclear-1 (NRF-1), este proceso es dependiente de la eNOS y de la biodisponibilidad del NO (Nisoli *et al.*, 2003; Nisoli *et al.*, 2004; Nisoli *et al.*, 2007; Nisoli *et al.*, 2005).

Existe un reconocimiento creciente de la importancia de la biogénesis y dinámica energética mitocondrial así como la producción de ROS en la diabetes. Las mitocondrias son orgánulos dinámicos en la célula. Se mueven, fusionan, dividen y forman redes tubulares que pueden favorecer la liberación de organelas en áreas de mayor demanda energética. El equilibrio entre los procesos de fusión y fisión se refiere como dinámica mitocondrial (Twig *et al.*, 2008; Menzies y Gold, 1979). La fusión es beneficiosa para la distribución mitocondrial y DNA. La mitocondria hija disfuncional producida por la fisión es eliminada de la célula por autofagia. La pérdida del balance entre los procesos de fisión y fusión se asocian a alteraciones en la función mitocondrial y ciertas condiciones patológicas. Estas mitocondrias disfuncionales incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno y reducen la síntesis de ATP.

La diabetes y la resistencia a la insulina están fuertemente relacionadas con anomalías en la función mitocondrial (Lowell y Shulman 2005; Kim *et al.*, 2008; Zorzano *et al.*, 2009). La glucosa y el metabolismo de los lípidos en gran parte dependen de la mitocondria para generar energía en las células. De esta manera, cuando la oxidación de nutrientes es ineficiente, la proporción de la producción de ATP/consumo de oxígeno es baja, dando lugar a un aumento de la producción de aniones superóxido. La formación de especies reactivas del oxígeno puede tener consecuencias desadaptativas que incrementan la tasa de mutagénesis y estimulan los procesos proinflamatorios (Kim *et al.*, 2008).

La disminución de la oxidación de los ácidos grasos por la mitocondria y/o la disminución de la masa mitocondrial pueden llevar a un incremento en la concentración de diacilgliceroles y la activación de la PKC, la cual bloquea la señal de insulina y activa el NFκB (Shoelson *et al.*, 2006; Lowell y Shoulman 2005). NFκB es también activado por citocinas inflamatorias y por el receptor para RAGE (Kim *et al.*, 2001; Bierhaus *et al.*, 1997; Bierhaus *et al.*, 2001). El incremento en la concentración de glucosa incrementa el potencial de la membrana mitocondrial y la producción de radicales (Brownlee 2001; Nishikawa *et al.*, 2000).

Se ha observado en estudios clínicos una alteración en la función mitocondrial en pacientes con diabetes. Por ejemplo, está disminuida la fosforilación oxidativa (Petersen *et al.*, 2004) y la expresión de genes de la fosforilación oxidativa en músculo esquelético (Patti *et al.*, 2003; Mootha *et al.*, 2003) de pacientes diabéticos (Petersen *et al.*, 2003) e hijos de diabéticos. El músculo esquelético de pacientes con diabetes se caracteriza por mitocondrias más pequeñas, disminución de la masa mitocondrial y disminución de la expresión génica relacionada con la biogénesis mitocondrial (Kim *et al.*, 2008; Patti *et al.*, 2003; Morino *et al.*, 2005; Kelley *et al.*, 2002; Ritov *et al.*, 2005). Cambios en el estilo de vida, incluyendo restricción calórica y ejercicio, conllevan a un incremento en la biogénesis mitocondrial (Kim *et al.*, 2008; Pilegaard *et al.*, 2003). Trabajos recientes han demostrado una relación entre la disfunción endotelial y alteración en la biogénesis mitocondrial y la producción de O_2^- en arteriolas

aisladas de pacientes con DM en comparación con los controles sanos (Widlansky *et al.*, 2009). Así, estudios experimentales han establecido firmemente una relación entre la disfunción mitocondrial y la diabetes, y este mecanismo parece contribuir con la disfunción endotelial en DM humana.

Las ROS derivadas de la mitocondria pueden dañar el DNA mitocondrial, alterando la expresión de enzimas de fosforilación oxidativa y disminuyendo la utilización de sustrato. Las proteínas desacopladoras mitocondriales (UCP's) previenen la hiperpolarización de la membrana y limitan la síntesis de O_2^- . Se ha observado que la sobreexpresión de UCP en músculo esquelético previene el desarrollo de diabetes y de obesidad inducida por la dieta y diabetes. La diabetes se ha asociado con una alteración en la biogénesis mitocondrial, fusión mitocondrial y autofagia, lo que provoca en la célula una menor masa mitocondrial y el predominio de fragmentos y mitocondrias disfuncionales (Li *et al.*, 2000).

En múltiples estudios se ha encontrado que la prevención en la producción de ROS o el realce en los sistemas antioxidantes celulares limitan la capacidad de la hiperglucemia para promover la activación y la disfunción endotelial. La inhibición de la producción del superóxido mitocondrial previene la producción de ROS inducida por hiperglucemia, la acumulación de AGE, y la activación de la PKC sugiriendo que ésta ruta juega un papel central en las respuestas de las células endoteliales inducida por hiperglucemia (Nishikawa *et al.*, 2000). El empleo del inhibidor del complejo II mitocondrial, tenoiltrifluoroacetona (TIFA, 2-*thenoyltrifluoroacetone*) o un mimético de la Mn SOD, cloruro de Mn TBAP redujo la producción de ROS inducida por hiperglucemia, a la vez que suprimió la expresión de genes inflamatorios (Quagliaro *et al.*, 2005; Quagliaro *et al.*, 2007) e incrementó la producción de NO (Quagliaro *et al.*, 2007).

Nishikawa y col. (2000) demostraron que, en células endoteliales aórticas bovinas (BAECs, *Bovine aortic endothelial cells*) expuestas a elevados niveles de glucosa coincubadas con CCCP (un desacoplador de la fosforilación oxidativa) se disminuye la producción de ROS.

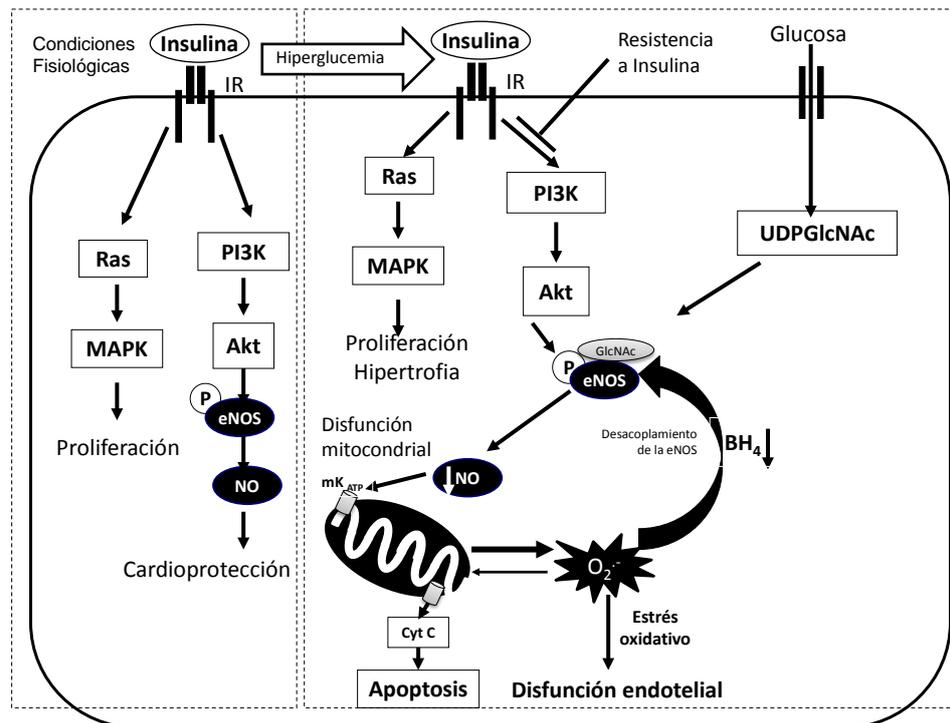
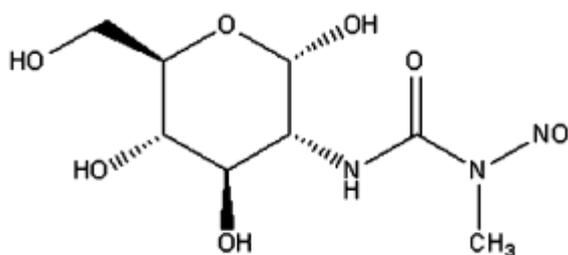


Figura 1. Esquema de la alteración de la señalización de la insulina PI3K-Akt-eNOS-NO como una característica de resistencia a insulina. Esquema modificado de Qiujun et al., 2011.

3. Modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ).

La inducción experimental de diabetes en animales de experimentación se realiza empleando sustancias con selectividad para destruir las células β pancreáticas. Los diabetógenos más usados para inducir diabetes en ratas son la aloxana y la estreptozotocina (Szkudelski, 2001).

La estreptozotocina (STZ, 2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa), es sintetizada por el *Streptomyces achromogenes* y es empleada para inducir tanto diabetes insulino dependiente como no insulino dependiente (IDDM, *insulin-dependent diabetes mellitus* y NIDDM, *non insulin-dependent diabetes mellitus*, respectivamente).



Estreptozotocina

Figura 2. Estructura química de Estreptozotocina.

La acción de la STZ sobre las células β está acompañada por alteraciones en las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa. Dos horas después de la administración, se observa hiperglucemia, alrededor de 6 horas más tarde, se pasa a un estado hipoglucémico acompañados de niveles elevados de insulina en sangre. Finalmente, se desarrolla la hiperglucemia y los niveles de insulina disminuyen (West *et al.*, 1996). Estos cambios en las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa, conllevan a alteraciones en las funciones de las células β pancreáticas. La STZ altera la oxidación de la glucosa (Bedoya *et al.*, 1996) y

disminuye la secreción y biosíntesis de la insulina (Bolaffi *et al.*, 1987, Nukatsuka *et al.*, 1990b). Se ha observado que la STZ elimina la respuesta de las células β a la glucosa, conllevando esto a una pérdida permanente en su respuesta (West *et al.*, 1996).

Con frecuencia se utiliza una sola dosis de entre 40 a 60 mg/Kg/peso vía intravenosa para inducir DM en ratas adultas (Ganda *et al.*, 1976). Cuando se administran 50 mg/Kg/peso de STZ vía intravenosa a las ratas, la glucosa en sangre (determinada 2 semanas después del tratamiento) puede alcanzar concentraciones de hasta 15 mM (Szkudelski T *et al.*, 1998).

Se ha descrito que el principal mecanismo por el cual la STZ, una vez en el interior de la células β a través del transportador GLUT2, induce la muerte de éstas es la alquilación del DNA (Delaney *et al.*, 1995, Elsner *et al.*, 2000), principalmente en la posición O⁶ de la guanina (Lenzen, 2007). La transferencia del grupo metilo desde la STZ a la molécula de DNA causa alteraciones, las cuales desencadenan una serie de eventos (Pieper *et al.*, 1999) que conducen a la fragmentación del DNA (Yamamoto *et al.*, 1982, Morgan *et al.*, 1994) y evocan a otros cambios deletéreos en las células. La alteración en el DNA inducida por STZ activa la poli ADP-ribosilación (Sandler y Swenne 1983) que lleva a la depleción de NAD⁺ y ATP (Uchigata *et al.*, 1982; Yamamoto *et al.*, 1981; Schein y Loftus, 1968; Sandler y Swenne, 1983) y la subsecuente inhibición de la síntesis y secreción de insulina (Nukatsuka *et al.*, 1990b). El agotamiento de la energía celular almacenada conduce a la necrosis de las células β .

Se ha propuesto como hipótesis alternativa que parte del efecto diabetógeno de la STZ puede deberse a su capacidad para donar NO intracelular (Turk *et al.*, 1993), como consecuencia del incremento en la actividad guanilil ciclasa y un aumento en la formación de GMPc (Turk *et al.*, 1993). La STZ se ha descrito como un donador de NO al presentar un grupo nitroso en su estructura (Krönche *et al.*, 1995). Esta molécula es liberada cuando la STZ es metabolizada dentro de las células (Krönche *et al.*, 1995). Numerosos estudios sugieren que el NO no es la

única molécula responsable del efecto citotóxico de la STZ, indicando que NO no es indispensable para la acción tóxica de la STZ como agente alquilante.

Finalmente, se ha observado que la STZ genera ROS, las cuales también contribuyen a la fragmentación del DNA y provocan otros cambios que deterioran las células (Takasu *et al.*, 1991b, Bedoya *et al.*, 1996). La formación de anión superóxido resulta tanto de la acción de la STZ sobre la mitocondria como del incremento en la actividad de la xantina oxidasa. Se ha demostrado que la STZ inhibe el ciclo de Krebs (Turk *et al.*, 1993) y subsecuentemente disminuye el consumo de oxígeno de la mitocondria (Nukatsuka *et al.*, 1990b).

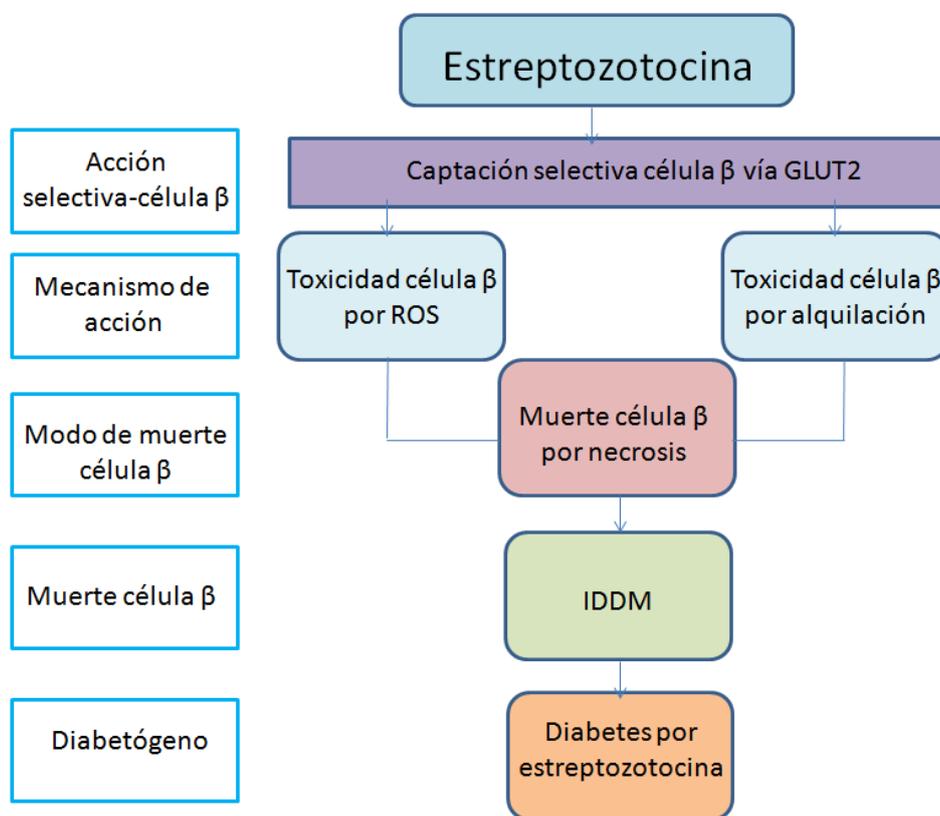


Figura 3. Esquema representativo de los efectos tóxicos de la estreptozotocina en células β induciendo una diabetes química. Esquema modificado de Lenzen, 2008.

4. Receptores activados por el proliferador de peroxisomas.

4.1. Receptores.

4.1.1. Introducción.

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares cuyo papel es eliminar el hidrógeno mediante el oxígeno molecular a través de enzimas oxidasas y catalasas; jugando un papel importante en procesos metabólicos celulares como el catabolismo del colesterol y la β -oxidación de los ácidos grasos (Vamecq y Draye, 1989). La proliferación de peroxisomas se observó por primera vez en ratas tratadas con clofibrato en 1960 (Duve, 1969).

En 1990, el primer receptor del proliferador de peroxisomas fue clonado a partir de hígado de ratón y se denominó receptor activado por el proliferador de peroxisomas, PPAR (del inglés, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) (Issemann y Green, 1990). Poco después, se identificaron tres tipos de receptores PPARs: PPAR α , PPAR β/δ (PPAR β) y PPAR γ (Dreyer *et al.*, 1992).

Los PPARs son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares. En el sistema de nomenclatura actual, PPARs se agrupan en la subfamilia 1C de receptores nucleares hormonales (PPAR α - NR1C1; PPAR β - NR1C2; PPAR γ - NR1C3) (Auwerx *et al.*, 1999). Las tres isoformas se expresan por distintos genes: el gen PPAR α está localizado en el cromosoma 22 en la región general 22q12-q13.1, el gen PPAR γ se encuentra en el cromosoma 3 en la posición 3p25, mientras que el gen PPAR β aparece en el cromosoma 6 en la posición 6p21.1-p21.2 (Yoshikawa *et al.*, 1996; Greene *et al.*, 1995; Sher *et al.*, 1993).

4.1.2. Características estructurales y mecanismo de acción.

La estructura de los PPARs incluye cinco o seis regiones estructurales en cuatro dominios funcionales, conocidos como A/B, C, D y E/F (Robinson y Grieve, 2009):

a) **El dominio amino-terminal A/B**, regula la actividad del PPAR, contiene un dominio funcional para la activación de la transcripción (AF-1, *transcriptional Activation Function*), el cual es independiente de ligando. La fosforilación en esta región regula la actividad transcripcional dependiendo del tipo de receptor. Así, por ejemplo, la insulina puede activar la transcripción de PPAR α vía fosforilación por MAPK en residuos de serina Ser¹² y Ser²¹ (Shalev *et al.*, 1996; Juge-Aubry *et al.*, 1999), mientras la fosforilación de Ser¹¹² por MAPK provoca la inactivación de PPAR (Adams *et al.*, 1997; Camp y Tafuri, 1997).

b) Un **dominio C o de unión al ácido desoxirribonucleico** (DNA, *DesoxiriboNucleic Acid*) (DBD, *DNA-Binding Domain*), en su estructura contiene dos “dedos de zinc” y promueve la unión del receptor a una secuencia del DNA en la región promotora de genes diana, conocida como elemento de respuesta del proliferador de peroxisomas (PPRE, *Peroxisome Proliferator Response Element*).

c) Un **dominio carboxilo-terminal E/F o dominio de unión a ligandos** (LBD, *Ligand-Binding Domain*) responsable de la especificidad de los ligandos y la activación de PPAR mediante la unión al PPRE de los genes diana (AF-2).

d) Un **dominio D**, o bisagra que hace posible los cambios conformacionales de plegamiento del receptor y su interacción con coactivadores y correpresores.

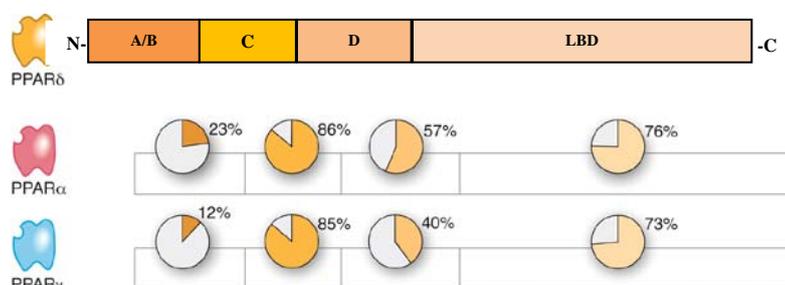


Figura 4. Esquema representativo de los dominios funcionales de PPARs y la similitud entre las isoformas. El dominio amino terminal A/B con acción activadora de la transcripción independiente de ligando (AF-1). El dominio C promueve la unión a una secuencia de DNA. El dominio D o “bisagra” une el dominio de unión de DNA al dominio de unión del ligando y actúa como sitio de unión de cofactores. El dominio E/F también recluta cofactores que ayudan al proceso de transactivación dependiente de ligando (AF-2). Esquema modificado de Ebrenborg y Krook, 2009.

Los PPARs son factores de transcripción que para ser transcripcionalmente activos necesitan formar un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR, *Retinoid X Receptor*, NR2B) (Kota *et al.*, 2005; Kliewer *et al.*, 1992). El heterodímero PPAR-RXR se une al PPRE, que consiste en repeticiones directas de la secuencia consensus, 5'-AGGTCA n AGGTCA-3', separada por uno (DR-1) o dos (DR-2) nucleótidos (Torra *et al.*, 2001) y localizada en la región promotora del gen diana. La unión se produce de tal manera que PPAR está siempre orientado al extremo 5' del DNA, mientras que RXR se orienta al extremo 3'.

Los ligandos de cualquiera de los receptores que conforman el heterodímero son capaces de inducir, independientemente, la transcripción de genes diana; pero cuando ambos receptores son activados simultáneamente resulta en un aumento sinérgico significativo de la transcripción de genes (Kliewer *et al.*, 1992; Mangelsdorf y Evans, 1995).

4.1.3. Coactivadores/correpresores de PPARs.

Un gran número de proteínas actúan como coactivadores o correpresores regulando la actividad de PPARs, bien estimulando o reprimiendo la transcripción genética, respectivamente.

En ausencia de ligando, el heterodímero PPAR-RXR se encuentra unido a proteínas correpresoras, como el mediador de silenciamiento para el receptor de la hormona tiroidea y retinoide (SMRT, *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptor*) y el correpresor de receptor nuclear (NcoR, *Nuclear receptor co-Repressor*), los cuales previenen la transcripción de genes a través de su actividad histona deacetilasa (Chen y Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1999).

Sin embargo, una vez que se une el ligando al receptor se produce un cambio conformacional que facilita la disociación del correpresor de tal forma que el heterodímero PPAR-RXR puede unirse al PPREs. Una vez activado, también permite la unión de varios coactivadores que promueven la iniciación de la transcripción (Chinetti *et al.*, 2000), como la proteína fijadora de PPAR (PBP, *PPAR-Binding Protein*) y el coactivador del receptor de esteroides (SRC-1, *Steroid Receptor Coactivator-1*) (Zhu *et al.*, 1997; Nolte *et al.*, 1998). Más recientemente se han identificado otros coactivadores como son las proteínas coactivadoras de PPAR γ (PGC-1, *PPAR γ Coactivator Protein*), PGC-1 α (Puigserver *et al.*, 1998) y PGC-1 β (Lin *et al.*, 2002), que se encuentran en los tejidos que presentan un alto metabolismo mitocondrial. Todo ello da lugar a cambios en los niveles de expresión de ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA, *messenger RiboNucleic Acid*) codificados por genes diana de PPAR.

La actividad de PPAR asimismo puede estar regulada a nivel postranscripcional por fosforilación, ubiquitinización y sumoilación (Feige *et al.*, 2006).

PPAR también regula la expresión génica de forma independiente de la unión a PPREs. Interfiere con otros tipos de factores de transcripción e influyen en su función sin la unión al DNA, a través de un mecanismo denominado

transrepresión dependiente del receptor (Daynes y Jones, 2002). La mayoría de los efectos antiinflamatorios de los PPARs probablemente puedan explicarse a través de este mecanismo (Kamei *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000). PPAR suprime las actividades de varios factores de transcripción, como el factor nuclear κ B (NF- κ B, *Nuclear Factor- κ B*), la proteína activadora 1 (AP-1, *Activator Proteína-1*), transductor de señales y activador de la transcripción (STAT, *Signal Transducer and Activator of Transcription*) y el factor nuclear de las células T activadas (NFAT, *Nuclear Factor of Activated T-cells*).

Hay tres mecanismos principales de transrepresión por los cuales complejos PPAR-RXR activados por ligando regulan negativamente la actividad de otros factores de transcripción:

a) En primer lugar, la transrepresión puede ser consecuencia de la competencia por cantidades limitadas de coactivadores que comparten. En condiciones en las que los niveles de coactivadores específicos están limitados, la activación de PPAR puede suprimir la actividad de otros factores de transcripción que utilizan el mismo coactivador (Delerive *et al.*, 1999 a y b).

b) En el segundo mecanismo, se cree que los heterodímeros PPAR-RXR activados actúan a través de la interacción física con factores de transcripción (AP-1, NF- κ B, NFAT ó STATs). Esta asociación evita que el factor de transcripción se una a su elemento de respuesta y por ello, inhibe su capacidad de inducir la transcripción de genes (Desreumaux *et al.*, 2001).

c) El tercer mecanismo de transrepresión se basa en la capacidad del heterodímero PPAR-RXR para inhibir la fosforilación y activación de ciertos miembros de la cascada MAPK (Johnson *et al.*, 1997), lo que

impide la activación de otros factores de activación que se encuentran más debajo de la cadena de señalización.

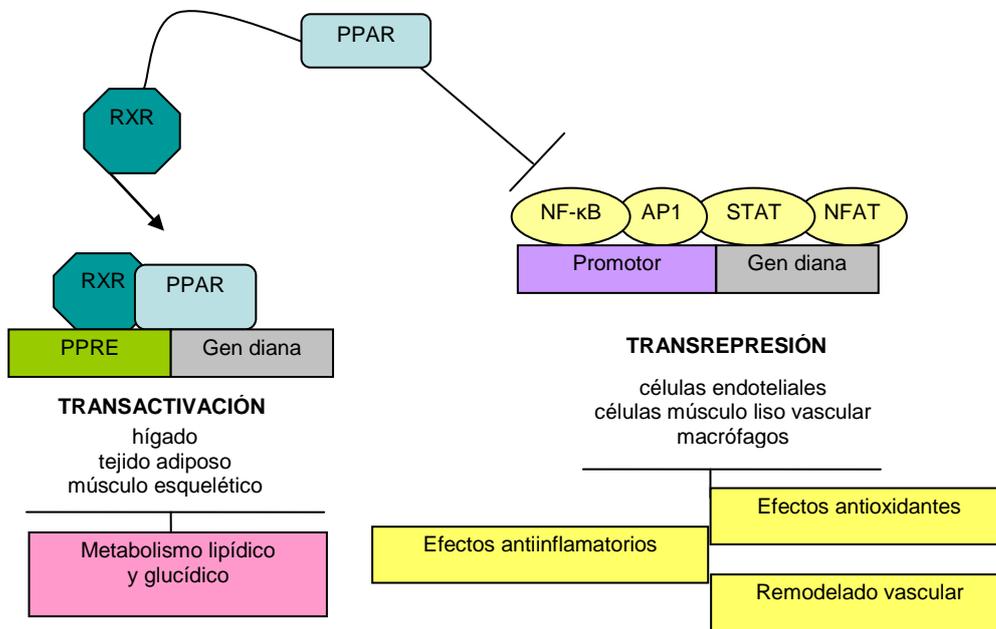


Figura 5. Mecanismo de acción de PPARs. Tras la activación por ligandos específicos, PPAR se heterodimeriza con RXR y se une al PPRE específico sobre el promotor de los genes diana, regulando el metabolismo glucídico y lipídico. Este proceso es denominado **transactivación** (izquierda). PPARs también interactúa con diferentes factores de transcripción (NFκB, AP-1, STAT y NFAT) independientemente de la unión al DNA, de esta forma reprime la transcripción de genes proinflamatorios y prooxidantes. Este proceso es denominado **transrepresión** (derecha).

4.1.4. Tipos de receptores PPAR.

Los PPARs pueden ser activados por ácidos grasos, en particular poliinsaturados, y regulan diversos aspectos de los procesos metabólicos, tales como la homeostasis glucídica y lipídica así como el control de la proliferación y diferenciación celular (Willson *et al.*, 2000; Berger y Moller, 2002).

a) PPAR α .

Se encuentra en tejidos con un elevado catabolismo de ácidos grasos y oxidación dependiente de peroxisoma, como el hígado, grasa marrón, corazón, riñón, músculo esquelético, mucosa intestinal y páncreas (Braissant *et al.*, 1996; Schoonjans *et al.*, 1996). Está involucrado principalmente en el metabolismo de lípidos y es activado por ligandos endógenos como por ejemplo leucotrieno B₄ (LTB₄) o ácido 8-hidroxi-eicosatetraenoico (8-HETE) y exógenos como los fibratos. Activa el catabolismo de ácidos grasos y estimula la gluconeogénesis (Keller *et al.*, 1993; Gulick *et al.*, 1994; Kersten *et al.*, 1999). Este aumento de la oxidación de ácidos grasos en respuesta a la activación de PPAR α da lugar a la reducción de los niveles de triglicéridos circulantes y del almacenamiento de lípidos en el hígado, músculo y tejido adiposo (Chou *et al.*, 2002). En consecuencia a todas sus acciones en el organismo, los fibratos son de amplio uso clínico para el tratamiento de dislipidemias.

La activación de PPAR α también posee efectos antiinflamatorios. En ratones modificados genéticamente deficientes en PPAR α , se observó una respuesta inflamatoria prolongada que se asoció a una degradación del mediador inflamatorio quimiotáctico, LTB₄ (Devchand *et al.*, 1996). Se sugiere que PPAR α podría mediar sus acciones antiinflamatorias a través de la reducción de la generación de citocinas. Esto podría deberse a la reducción de la actividad de NF- κ B y, como consecuencia de la ciclooxigenasa inducible, COX-2 y de citocinas proinflamatorias (Poyner y Daynes, 1998; Staels *et al.*, 1998).

b) PPAR γ .

Se expresa principalmente en el tejido adiposo y vascular, el hígado y las células del sistema inmune. Se relaciona con la adipogénesis y la homeostasis de la glucosa, y es activado por ligandos endógenos como la deoxiprostaglandina J2 (15d-PGJ2), el ácido 15-hidroxicicosatetraenoico (15-HETE) o el ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE) y exógenos como las tiazolidindionas. Está implicado en la diferenciación de adipocitos y el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo blanco (Tontonoz *et al.*, 1994; Rosen *et al.*, 1999). PPAR γ participa en el metabolismo de la glucosa a través de una mejora de sensibilidad a la insulina (Kubota *et al.*, 1999; He *et al.*, 2003; Hevener *et al.*, 2003), por lo tanto, agonistas sintéticos de PPAR γ (tiazolidindionas, glitazonas) se usan como antihiperglucemiantes al incrementar o sensibilizar la acción de la insulina para tratar a los pacientes con diabetes tipo 2. PPAR γ regula numerosos genes implicados en la señalización de la insulina y en el control de la expresión de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor α*). La activación de PPAR γ reduce significativamente la producción de TNF- α por adipocitos, el cual juega un papel estabilizador en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Moller, 2000). En diabetes, PPAR γ mejora la homeostasis de la glucosa al incrementar el transporte de glucosa en adipocitos, regula la liberación de la hormona derivada de adipocitos, resistina, disminuye la formación de glucosa e incrementa su disponibilidad en el músculo esquelético (Kota *et al.*, 2005).

Al igual que PPAR α , se han descrito efectos antiinflamatorios para los receptores PPAR γ . La expresión de PPAR γ está marcadamente incrementada en los macrófagos activados y el aumento de su actividad, mediada por el activador PGJ2, se ha visto que inhibe la actividad de NF κ B, AP-1 y STAT, factores de transcripción que incrementan la expresión de citocinas proinflamatorias (Ricote *et al.*, 1998).

La activación de PPAR γ estimula la diferenciación celular y la apoptosis por lo que se ha sugerido que podrían ser beneficiosos en el tratamiento de cánceres. Por ejemplo, se ha visto que los agonistas de PPAR γ presentan efectos antitumorales en cánceres de pecho (Mueller *et al.*, 1998), colon (Jackson *et al.*, 2003) y próstata (Kubota *et al.*, 1998) tanto en estudios realizados en células aisladas como en animal entero.

Inicialmente se creía que los PPARs regulaban los genes que participan sólo en el metabolismo lipídico y glucídico (Marx *et al.*, 2004). En los últimos años, se sugiere que la activación del PPAR α o PPAR γ puede ejercer una protección cardiovascular más allá de sus efectos metabólicos (Leibovitz *et al.*, 2007). Los resultados muestran un perfil cardiovascular favorable debido a sus efectos antiateroscleróticos, antiinflamatorios y vasodilatadores (Schiffrin *et al.*, 2003), y a su capacidad para inhibir la proliferación de las células del músculo liso vascular (CMLV) y endoteliales (Lee *et al.*, 2006; Benkirane *et al.*, 2006), para reducir la hipertrofia cardíaca (Asakawa *et al.*, 2002), para inhibir la agregación plaquetaria (Moraes *et al.*, 2007) y para disminuir la presión arterial (Khan *et al.*, 2005; Iglarz *et al.*, 2003). Los agonistas PPAR α o PPAR γ ejercen efectos antihipertensivos en modelos humanos y animales con o sin trastornos metabólicos (Raji *et al.*, 2003; Füllert *et al.*, 2002; Schiffrin, 2005; Diep *et al.*, 2002). Los mecanismos subyacentes a los efectos beneficiosos de los PPARs más allá del metabolismo glucídico y lipídico, pueden estar relacionados con sus acciones antiinflamatorias y antioxidantes. Así, la activación de PPAR α o PPAR γ antagoniza las acciones de la Ang II, la activación de NADPH oxidasa y la generación de ROS, así como el aumento de mediadores proinflamatorios y moléculas de adhesión en los vasos sanguíneos.

c) PPAR β .

A pesar de ser el receptor PPAR más ampliamente expresado en los tejidos humanos, su papel fisiológico y fisiopatológico es menos conocido. Se ha implicado en la formación de tejido adiposo (Vosper *et al.*, 2001), el desarrollo del cerebro (Cimini *et al.*, 2005), la proliferación de células (Piqueras *et al.*, 2007), la función placentaria (Barak *et al.*, 2002) y la inflamación (Lee *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que PPAR β se expresa de forma ubicua en ratas adultas, aunque en algunos estudios, existen grandes diferencias en la expresión en el corazón y el hígado (Braissant *et al.*, 1996). Curiosamente, la expresión de PPAR β se pone en cuestión cuando nos fijamos en el patrón de desarrollo en la piel, que está bien caracterizado. PPAR β está presente en los queratinocitos de ratón durante el desarrollo fetal y desaparece tras el nacimiento (Michalik *et al.*, 2001), mientras que en los seres humanos, la expresión PPAR β sigue siendo elevada en queratinocitos diferenciados (Rivier *et al.*, 1998; Matsuura *et al.*, 1999; Westergaard *et al.*, 2001), lo que es necesario para mantener las diferencias entre especies potenciales en la expresión PPAR β .

Los ligandos endógenos para PPAR β son los ácidos grasos, triglicéridos, prostaciclina y ácido retinoico (Xu *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2003; Sznajdman *et al.*, 2003).

A continuación se describirán más detalladamente las características y efectos de este receptor clave en el desarrollo de la Tesis Doctoral.

4.2. Ligandos específicos PPAR β .

Estudios de cristalografía de rayos X de PPAR β revelaron un sitio excepcionalmente grande de unión al ligando, de aproximadamente 1.300 Å³, similar al de PPAR γ pero mucho más grande que los sitios de unión de otros receptores nucleares (Takada *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1999). Se cree que la mayor

dimensión es para dar cabida a la unión de varios ácidos grasos y otros ácidos anfipáticos a PPAR β a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Varios ácidos grasos saturados (de 14 a 18 carbonos) así como ácidos grasos poliinsaturados (de 20 carbonos) se unen a PPAR β con afinidades de rango micromolar (Forman *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1995; Krey *et al.*, 1997). Concentraciones similares de sustancias sintéticas y naturales como eicosanoides, prostaglandina A1, iloprost (análogo sintético de la prostaciclina), prostaglandina 15d-J2 y carbaprostaciclina sirven como eficaces activadores de PPAR β . Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*) mejoran la expresión de genes diana de PPAR β de una manera dependiente del receptor, lo que sugiere que una variedad de ácidos grasos-VLDL podrían servir como agonistas de los receptores endógenos. Por otra parte, la química combinatoria y el diseño de fármacos han facilitado el desarrollo de agonistas sintéticos con afinidad nanomolar para PPAR β (Tabla 1) (Barish *et al.*, 2006). A diferencia de PPAR α (fibratos) o PPAR γ (glitazonas) no existen actualmente agonistas de PPAR β que se utilicen en clínica, aunque algunos compuestos, como el GW501516, se encuentran en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de dislipemias. Recientemente, el primer antagonista sintético de PPAR β (GSK0660) ha sido identificado (Shearer *et al.*, 2008).

Tabla 1. Ligandos de PPAR β .

Ligandos	Naturaleza	Afinidad	Estado clínico
<i>Agonistas endógenos</i>			
Ácidos grasos insaturados	Ácidos grasos de la dieta	μM	
Ácidos grasos saturados	Ácidos grasos de la dieta	μM	
Prostaglandín A1	Prostaglandina endógena	μM	
<i>Agonistas sintéticos</i>			
Carbaprostaciclina	Análogo sintético estable de PGI ₂	μM	
Iloprost	Análogo de prostaciclina	μM	
Compuesto F	Derivado del ácido fenoxiacético	nM	
L165041	Derivado del ácido fenoxiacético	nM	
GW501516	Derivado del ácido fenoxiacético	nM	
GW0742	Derivado del ácido fenoxiacético	nM	
KD2010	No se revela	nM	Fase I
MBX	No se revela	nM	Fase II
<i>Agonistas duales sintéticos</i>			
Compuesto 23	Agonista dual para γ y β	nM	
<i>Antagonistas sintéticos</i>			
GSK0660	Antagonista para β	nM	
GSK3787	Antagonista para β	nM	
Sulindac	Agonista γ y antagonista β		

4.3. Efectos de los PPAR β .

La mayoría de la información que existe sobre sus efectos fisiológicos y fisiopatológicos proviene de estudios de sobreexpresión y modelos de ratones knockout y transgénicos, ya que hasta relativamente hace poco tiempo no se habían desarrollado agonistas selectivos de PPAR β .

Debido a su naturaleza ubicua se han descrito una gran variedad de funciones. Al igual que PPAR α y PPAR γ , PPAR β participa en la regulación de los niveles de lípidos circulantes y de glucosa (Berger *et al.*, 1999). También, se ha visto que modula la resistencia a la insulina a través de la activación de macrófagos inhibiendo la inflamación tanto en tejido adiposo como en hígado (Kang *et al.*, 2008; Odegaard *et al.*, 2008). Además, parece probable que la activación de PPAR β está implicada en la fertilidad y el embarazo, ya que se expresa abundantemente en las zonas de implantación dentro del útero (Lim *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2003). PPAR β fue inicialmente implicado en el desarrollo de tumores (Gupta *et al.*, 2000), pero existen estudios recientes donde se sugiere que su activación podría atenuar la carcinogénesis (Harman *et al.*, 2004). PPAR β puede interferir con la señalización de NF- κ B (Ding *et al.*, 2006; Rival *et al.*, 2002; Shan *et al.*, 2008), lo que lleva a actividades antiinflamatorias asociadas con PPAR β y sus ligandos. Las actividades antiinflamatorias de PPAR β pueden estar mediadas en parte por las interacciones con STAT3 y quinasas reguladas por señal extracelular (ERKs, *Extracellular signal-Regulated Kinases*) (Kino *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2006). Cabe señalar que la inhibición de la señalización de STAT3, por interactuar con PPAR β (Kino *et al.*, 2007), también puede ser importante en la carcinogénesis, ya que STAT3 está a menudo sobreexpresado en muchos cánceres, incluyendo cáncer de colon, y se asocia con el aumento antiapoptótico de la señalización (Hodge *et al.*, 2005). PPAR β puede modular la señalización inflamatoria y posiblemente el crecimiento celular al interferir directamente con una serie de factores de transcripción.

El hecho de que se exprese altamente en el sistema nervioso central ha generado un gran interés su papel potencial en patologías neuronales.

Los diferentes efectos de PPAR β que se describen tras la activación de los receptores en los distintos tejidos se deben principalmente a la disponibilidad de cofactores específicos en cada tejido, a la expresión de genes diana, al proceso de heterodimerización y a modificaciones post-transcripcionales (Wagner y Wagner, 2010).

A continuación se describen algunos de sus principales efectos en tejido adiposo, músculo esquelético y sistema cardiovascular.

4.3.1. PPAR β y el tejido adiposo.

PPAR γ es inducido durante el proceso de diferenciación de adipocitos, y una expresión forzada del receptor en células no adipogénicas las convierte eficazmente en adipocitos maduros. Al igual que PPAR γ , se ha descrito que los PPAR β también participan en el proceso de diferenciación de los adipocitos. En 1999, Grimaldi y colaboradores forzaron la expresión de PPAR γ en fibroblastos Swiss 3T3C2, refractarios a la diferenciación adiposa. Observaron que el tratamiento bien con ácidos grasos (activadores de PPAR β) solos o con agonistas PPAR γ no era suficiente para desencadenar la diferenciación de adipocitos, sin embargo, la coincubación de ambos promovía la diferenciación. Estos datos sugerían que la expresión génica de PPAR γ estaba bajo el control de la activación de PPAR β por parte de los ácidos grasos. También, observaron que la sobreexpresión de PPAR β aumentaba la expresión de genes relacionados con el tejido adiposo en líneas celulares de preadipocitos, Ob1771 y 3T3-F442A (Bastie *et al.*, 1999). Una forma deficiente de transactivación de PPAR β , mediante una mutación en el dominio AF-2, reduce drásticamente los efectos arriba descritos indicando que PPAR β juega un papel clave en el proceso de diferenciación de células preadiposas controlado por ácidos grasos (Bastie *et al.*, 2000).

Estudios genéticos y farmacológicos revelan su papel como un poderoso regulador del catabolismo de ácidos grasos y la homeostasis energética. En un principio, debido a la falta de un agonista PPAR β específico, se utilizaron ratones transgénicos que expresaron la forma activa de PPAR β por la fusión con un dominio de activación de la proteína viral (VP16, *Viral Protein 16*) para descubrir su función específica en el tejido. La expresión en el tejido adiposo de este transgén produjo ratones delgados que eran resistentes a la obesidad y la esteatosis hepática inducida en este tejido, ya sea genéticamente o por una dieta alta en grasas.

En 2003, cuatro grupos de investigación de forma independiente observaron que la activación de los efectos de PPAR β protegía contra la obesidad (Wang *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Dressel *et al.*, 2003; Holst *et al.*, 2003). En 2003, Wang y colaboradores describieron que la sobreexpresión de la forma activa de PPAR β constitutiva en el tejido adiposo blanco y marrón regulaba al alza genes implicados en la oxidación de ácidos grasos y el gasto energético. La sobreexpresión adiposa específica de PPAR β o el tratamiento con el agonista PPAR β , GW501516, previene el desarrollo de la obesidad en ratones db/db (diabéticos) al restaurar la capacidad oxidativa del tejido adiposo marrón y reducir la acumulación intracelular de triglicéridos en este tejido y en el hígado (Wang *et al.*, 2003). Además, la activación de PPAR β en los adipocitos (preadipocitos 3T3-L1) y miotubos (células C2C12) *in vitro*, promueve la β -oxidación de los ácidos grasos. También encontraron que el coactivador PGC-1 α , un componente central de la termogénesis adaptativa, es también un potente coactivador de PPAR β . Sugirieron que PPAR β sirve como un regulador general de la quema de grasa en los adipocitos y músculo esquelético.

Un estudio realizado en pacientes obesos confirma las grandes diferencias en la distribución tisular de los PPARs (Bortolotto *et al.*, 2007). En sujetos control no obesos la expresión de PPAR β fue mayor en el tejido adiposo subcutáneo en comparación con el tejido adiposo visceral. En pacientes obesos la expresión de PPAR β estaba reducida en el tejido adiposo subcutáneo y visceral, y se

correlacionó negativamente con el tamaño de la cadera y los niveles de insulina. Resultados que corroboran el posible uso clínico de estos agonistas en el tratamiento del síndrome metabólico.

Se ha demostrado que el agonista PPAR β , GW501516, inhibe la expresión y secreción de citoquinas inducidas por el lipopolisacárido (LPS), ya que previene la activación de NF- κ B en los adipocitos (Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008). Es de destacar que la activación de NF- κ B por LPS requiere la activación de ERK 1/2, ya que la inhibición de esta vía inducida por LPS disminuye la producción de citocinas en los adipocitos (Chung *et al.*, 2006). Por el contrario, los adipocitos secretan interleukinas 13 y 4, las cuales inducen la expresión de PPAR β en macrófagos (Kang *et al.*, 2008). A través de esta vía los macrófagos adquieren un fenotipo antiinflamatorio, el cual está relacionado con un incremento en la sensibilidad a insulina por parte del tejido adiposo.

4.3.2. PPAR β y el músculo esquelético.

PPAR β es la isoforma predominante en el músculo esquelético de roedores y humanos (Braissant *et al.*, 1996; Muoio *et al.*, 2002; de Lange *et al.*, 2004), con una mayor expresión en fibras musculares tipo I (oxidativas) que en fibras tipo II (glucolíticas) (Wang *et al.*, 2004).

Existen factores fisiológicos y fisiopatológicos que pueden influir en el contenido de PPAR β como el ejercicio, la inactividad, el ayuno, lípidos así como ciertas patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el daño en la médula espinal (Ehrenborg y Krook, 2009). Tanto el ejercicio a corto plazo como el de resistencia aeróbica durante un período largo de tiempo incrementan la expresión de PPAR β en músculo esquelético de humanos y roedores.

El contenido en PPAR β también se encuentra bajo el control nutricional. Períodos de ayuno de 6-, 24- y 48 horas dan lugar a una regulación al alza del mRNA en el músculo gastrocnemius en ratón (de Lange *et al.*, 2006), alcanzando niveles normales tras la realimentación (Holst *et al.*, 2003). En contra, el ayuno

durante 12 horas en ratas no altera los niveles de mRNA en músculo esquelético (pero si reduce su expresión en riñón e hígado) (Escher *et al.*, 2001). Por otro lado sorprende que exista una regulación a la baja de la expresión de mRNA de PPAR β en el músculo esquelético en humanos sanos después de 48 horas de ayuno (Tsintzas *et al.*, 2006). Parece probable que tras la falta de alimentos exista un incremento rápido pero transitorio de la expresión de PPAR β en músculo esquelético, correlacionado con una acumulación rápida a nivel nuclear de PPAR β y el coactivador PGC1 α (de Lange *et al.*, 2006) lo que daría lugar a cambios en la expresión de genes que regulan el metabolismo de los ácidos grasos.

El entrenamiento físico moderado y el ayuno, ambos, incrementan los ácidos grasos libres, los cuales actúan como una señal fisiológica en la regulación del contenido de PPAR β en músculo esquelético. Sin embargo, el ejercicio de resistencia realizado ya sea en ayunas o tras la ingestión de hidratos de carbono (evitando un incremento en ácidos grasos) resulta en un aumento similar de la expresión de mRNA de PPAR β , sugiriendo que la contracción *per se* es el principal regulador (Russell *et al.*, 2005).

El músculo esquelético juega un papel central en el metabolismo lipídico (Kiens, 2006; Houmard, 2008). Los ácidos grasos libres entran en el músculo bien por difusión o a través de transportadores de membrana como CD36, FABPpm y FATP1. Una vez en el interior, los ácidos grasos son activados en el citosol al reaccionar con la coenzima A y ATP formando complejos de acil-CoA, los cuales penetran en el interior de la mitocondria para su oxidación. Genes implicados en la entrada de ácidos grasos al interior del miocito y su subsiguiente oxidación han sido identificados como genes diana de PPAR β . Hasta la fecha, la mayoría de los datos indican que la activación de PPAR β aumenta el catabolismo de ácidos grasos en modelos celulares *in vitro* (Muoio *et al.*, 2002; Krämer *et al.*, 2007; Kleiner *et al.*, 2009), en músculo esquelético aislado (Brunmair *et al.*, 2006) así como en modelos *in vivo* (Tanaka *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003, 2004; Constantin *et al.*, 2007; Jucker *et al.*, 2007). Tanaka y colaboradores (2003) indicaron que el agonista PPAR β , GW501516, controla la oxidación de ácidos grasos mediante la regulación

de genes implicados en el transporte de ácidos grasos, la β -oxidación y la respiración mitocondrial en miotubos L6 de rata.

En músculo esquelético, el incremento de la actividad de PPAR β aumenta la expresión de genes que regulan la oxidación lipídica como son carnitil-palmitoil-transferasa (CPT, *Carnitine palmitoyltransferase*), CD36 y piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK, *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*). La activación de PDK resulta en la inactivación del complejo piruvato deshidrogenasa, paso limitante de la velocidad de oxidación de carbohidratos en el músculo esquelético. Por tanto, la inhibición del complejo puede ser considerado un punto primordial al poder alterar la elección de fuente de energía hacia la oxidación de ácidos grasos disminuyendo la utilización de glucosa. En el músculo esquelético están presentes dos isoformas de PDK, PDK2 y PDK4 (Holness *et al.*, 2000). PDK4 ha sido identificada como el gen diana tras la activación de PPAR β .

Varios trabajos demuestran que la activación de PPAR β promueve un aumento moderado en el músculo de la densidad mitocondrial, pero la implicación real de PPAR β en la biogénesis mitocondrial sigue sin estar clara.

Los agonistas PPAR β , GW501516 y GW0472, aumentan la captación de glucosa de forma independiente a la insulina en células C2C12 y miotubos primarios de músculo esquelético humano (Krämer *et al.*, 2005, 2007). El efecto fue coincidente con el incremento en la expresión y la fosforilación de ERK 1/2 activada por MAPK, p38 MAPK y la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase*) (Krämer *et al.*, 2005). Por tanto, la activación de PPAR β induce la β -oxidación de ácidos grasos y el transporte de glucosa en el músculo esquelético.

El tratamiento con GW501516 redujo significativamente la ganancia de peso, pero no se afectó el consumo de comida en los animales alimentados con una dieta alta en grasas. El tratamiento con un agonista PPAR β también mejoró la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas, probablemente como consecuencia del aumento de la quema de grasa en el músculo y la mejora general en el metabolismo de los lípidos sistémicos. El tratamiento con GW501516 evita

la acumulación de lípidos hepáticos y mejora la sensibilidad a la insulina en ratones ob/ob y en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa. Es interesante que los cambios en la expresión genética inducidos por GW501516 en el cultivo de miotubos y el músculo esquelético *in vivo* originan un perfil muy similar a la expresión genética inducida por la exposición al frío, el ayuno y el ejercicio prolongado. Además, se ha observado que GW501516 en los islotes pancreáticos aislados de ratones de tipo salvaje con una dieta normal estimula de manera significativa la liberación de insulina inducida por glucosa *in vitro*. Dressel y colaboradores (2003) vieron un efecto similar con GW501516 en miotubos C2C12, una línea de células de músculo esquelético de ratón, lo que indica que los agonistas PPAR β inducen la expresión de genes implicados en la utilización de lípidos, la β -oxidación, el eflujo del colesterol y el desacoplamiento energético.

Niveles plasmáticos elevados de ácidos grasos libres causan resistencia a la insulina en músculo esquelético a través de la activación de un proceso inflamatorio crónico. En este proceso está involucrado la activación de NF- κ B como resultado de la acumulación de DAG y la subsiguiente activación de la proteína quinasa C θ (PKC θ). En células de músculo esquelético, C2C12, el agonista GW501516 previene la fosforilación de IRS-1 en residuos de serina³⁰⁷ y la inhibición de la fosforilación de AKT, inducida por insulina, tras la exposición con el ácido graso saturado, palmitato. El tratamiento con el agonista incrementa la expresión de dos genes diana de PPAR β involucrados en la oxidación de ácidos grasos, CPT-1 y PDK4, e incrementa la fosforilación de AMPK, previniendo la reducción de la oxidación de ácidos grasos inducida por la exposición con el palmitato. De acuerdo con estos resultados, el tratamiento con GW501516 previene la resistencia a la insulina y la inflamación en músculo esquelético al prevenir la acumulación de DAG, la activación de PKC θ y, por lo tanto, la subsiguiente activación de NF- κ B y citocinas proinflamatorias, IL-6, involucrados en el desarrollo de resistencia a la insulina (Coll *et al.*, 2010). Estos efectos podrían aportar una estrategia terapéutica potencial para la prevención de la resistencia de insulina inducida por lípidos.

La angiogénesis inducida por PPAR β en el músculo esquelético y el corazón es una reminiscencia a la inducida en ambos tejidos por el ejercicio físico periódico y podría contribuir a un apropiado suministro de oxígeno necesario para un mayor metabolismo oxidativo y la protección contra la isquemia/reperfusión del corazón (Gaudel *et al.*, 2008).

Un estudio reciente demuestra que la activación de PPAR β (GW0742), además de incrementar el número de miofibrillas oxidativas y capilares en músculo esquelético, promueve la acumulación mionuclear (Giordano *et al.*, 2009), respuesta característica del ejercicio (Allen *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2006). La densidad mionuclear incrementada ha sido descrita en animales transgénicos con sobreexpresión específica en el músculo así como en ratones wild-type tratados durante dos días con un agonista PPAR β . El incremento en la densidad mionuclear en respuesta a la activación de PPAR β no se debe a un aumento en la proliferación, sino a la fusión de células progenitoras musculares con miofibras (Giordano *et al.*, 2009). El envejecimiento de ratones se ha asociado con una reducción en la expresión de PPAR β y del número de miofibras oxidativas y de mionucleos, lo que podría ser parcialmente revertido mediante la activación farmacológica de PPAR β ; por lo que se ha sugerido un potencial uso de los agonistas PPAR β en el tratamiento de la atrofia muscular relacionada con la edad (Giordano *et al.*, 2009).

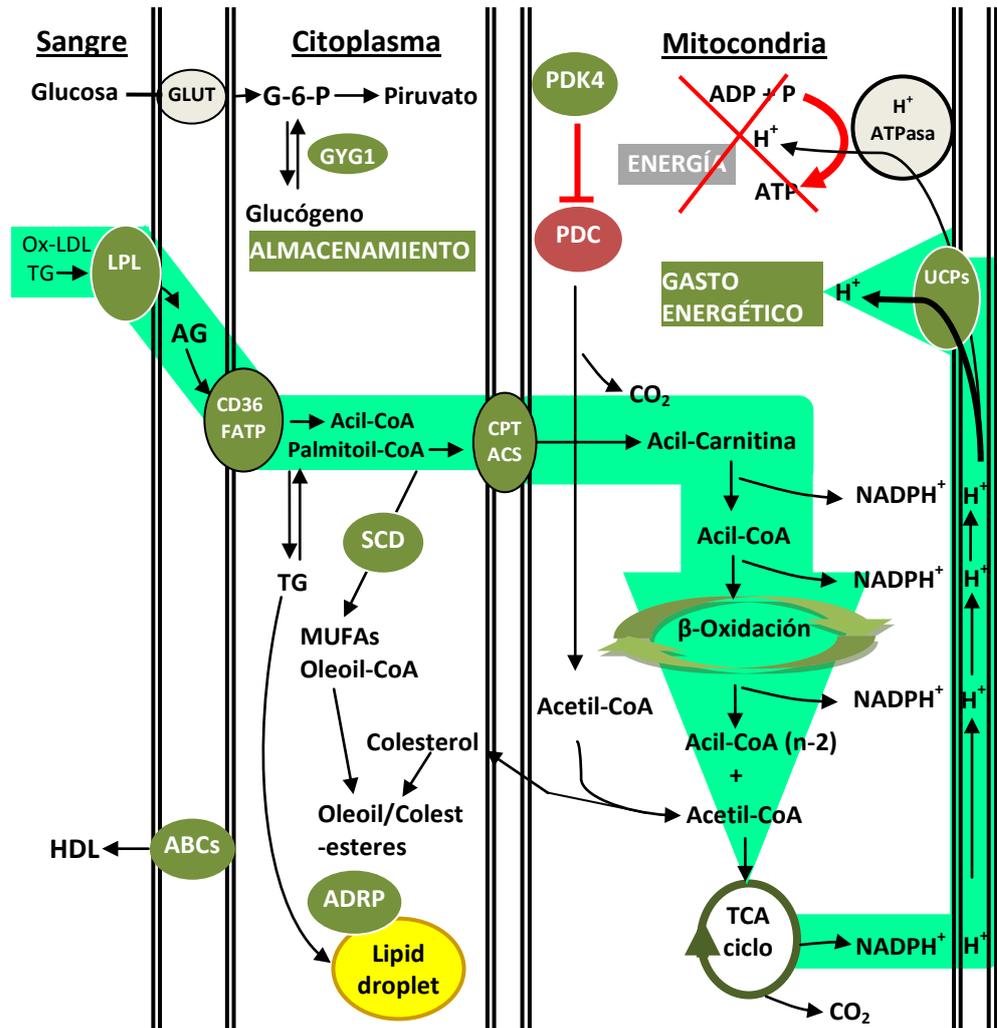


Figura 6. Esquema de las acciones metabólicas de PPAR β . Las enzimas y funciones que son activadas por PPAR β están marcadas en verde. El color rojo indica la inhibición de vías. Las flechas en verde representan la absorción y oxidación de ácidos grasos (AG), seguido del desacoplamiento de la oxidación de la síntesis de ATP. ACS: acil-CoA sintetasa; ADRP: adipocyte differentiation-related protein; CPT: carnitine palmitoyl transferase, FATP: fatty acid transport protein; GLUT: glucose transporter, HDL: high-density protein; LDL: low density lipoprotein; LPL: lipoprotein lipase; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PDC: pyruvate dehydroxygenase complex; PDK: pyruvate dehydroxygenase kinase; SCD: stearyl CoA desaturase; TCA: tricarboxylic acid; TG: tyglicerides; UCPs: uncoupling proteins. Esquema modificado de Dressel et al., 2003.

4.3.3. PPAR β y sistema cardiovascular.

Los PPARs se expresan ampliamente en el sistema cardiovascular, pared vascular y miocardio, donde se ha demostrado que presentan efectos independientes a sus acciones metabólicas. En el sistema cardiovascular los PPAR reducen la presión arterial, participan en la regulación de la migración y proliferación celular, el estrés oxidativo y la inflamación. (Schiffrin *et al.*, 2003; Schiffrin, 2005; Robison y Grieve, 2009).

-Función cardíaca/miocitos.

De forma similar a los estudios realizados en tejido adiposo y músculo esquelético, diferentes modelos celulares, *in vitro*, y farmacológicos y transgénicos, *in vivo*, han ayudado a conocer la función de PPAR β en el corazón.

En células H9C2, línea celular de cardiomioblastos de rata, se ha observado una inhibición de la apoptosis inducida por H₂O₂ en respuesta a la activación farmacológica de PPAR β con el agonista GW501516. Este efecto se ha atribuido a un incremento en la expresión de catalasa tras la activación de PPAR β (Pesant *et al.*, 2006). Sin embargo, en ratones tratados con el mismo agonista PPAR β *in vivo* no se encontraron diferencias en la apoptosis entre animales controles y tratados, lo cual no sorprende ya que la capacidad apoptótica de los miocitos en condiciones basales es muy baja (Wagner *et al.*, 2009). Por tanto, sería un reto el tratamiento con agonistas específicos de PPAR β en animales con apoptosis cardíaca aumentada y observar si reduce la apoptosis y, mucho más interesante, si resulta un beneficio funcional.

Un efecto protector de PPAR β en el corazón se ha demostrado a través de distintos estudios. En primer lugar, se observó que en ratones deficientes específicamente de PPAR β en cardiomiocitos desarrollaban en cuatro meses una cardiomiopatía dilatada debido a lipotoxicidad (Cheng *et al.*, 2004). En segundo lugar, se ha descrito que el agonista L165041 inhibe la hipertrofia inducida por

fenilefrina en cardiomiocitos neonatales a través de la interacción de PPAR β con NF- κ B y la subsiguiente regulación a la baja de sus genes diana (Planavila *et al.*, 2005a, b). Además, PPAR β estimula la expresión de I κ B α , el cual se une a NF- κ B previniendo su translocación nuclear y la subsiguiente regulación de sus genes diana (Hall *et al.*, 2006). En tercer lugar, la activación de PPAR β por GW0742 reduce la hipertrofia inducida por Ang II en cardiomiocitos neonatales, lo cual se asoció a una disminución de los niveles del péptido natriurético atrial y de cerebro así como a una restauración de la expresión de PPAR β , reducida tras la sobreestimulación de Ang II (Sheng *et al.*, 2008). En cardiomiocitos adultos la exposición prolongada con Ang II reduce moléculas clave en la oxidación de ácidos grasos, como la translocasa de ácidos grasos, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena media, lo cual podría prevenirse tras la activación de PPAR β o la inhibición de la vía de señalización de NF- κ B (Pellieux *et al.*, 2007). El daño cardíaco se asocia, a menudo, a una reducción de la capacidad de oxidación de ácidos grasos en el miocardio, por tanto la activación de PPAR β farmacológicamente podría ser una buena propuesta terapéutica, aunque esta conclusión no puede ser concluyente a partir de los experimentos realizados en cultivos de cardiomiocitos.

El efecto de PPAR β en el músculo esquelético se ha ampliado al campo de investigación del metabolismo lipídico cardíaco. Gilde y colaboradores (2003) describen que PPAR α y PPAR β , pero no PPAR γ , desempeñan un papel destacado en la regulación del metabolismo de los lípidos cardíacos. Además, el agonista PPAR β , GW0742, restaura parcialmente la expresión de genes clave en la oxidación de los ácidos grasos en cardiomiocitos de ratones adultos PPAR α ^{-/-} (Cheng *et al.*, 2004a). Ratones deficientes de PPAR β en el miocardio desarrollan disfunción cardíaca, una progresiva acumulación de lípidos en el miocardio, hipertrofia e insuficiencia cardíaca congestiva con una reducida tasa de supervivencia (Cheng *et al.*, 2004b). El agonista PPAR β , GW0742, incrementa los niveles de transcripción de la oxidación de ácidos grasos en cultivo de cardiomiocitos de ratones PPAR β ^{+/+}, pero el efecto no se observa en los

cardiomiocitos de ratones PPAR β ^{-/-}. El agonista PPAR α , WY14643, restauró la disminución de los niveles de la transcripción de la oxidación de ácidos grasos en las células de ratones PPAR β ^{-/-}. Los datos indican que PPAR β está involucrado en la oxidación de ácidos grasos cardíacos al igual que PPAR α .

Burkart y colaboradores (2007) observan que en ratones con sobreexpresión cardíaca de PPAR β la utilización de glucosa en el miocardio está aumentada, la función cardíaca es normal y no existe una acumulación de lípidos en el miocardio a diferencia de animales transgénicos de PPAR α . En contra de los estudios en cultivos de cardiomiocitos mencionados anteriormente, los genes involucrados en el transporte de ácidos grasos no fueron activados por PPAR β pero sí por PPAR α , y a la inversa, el transporte cardíaco de glucosa y las enzimas glucolíticas estaban activadas en los ratones con sobreexpresión de PPAR β y, sin embargo, reprimidas en los animales transgénicos PPAR α . En línea con estos hallazgos, los autores determinaron la activación del promotor GLUT-4 por PPAR β y su represión por parte de PPAR α .

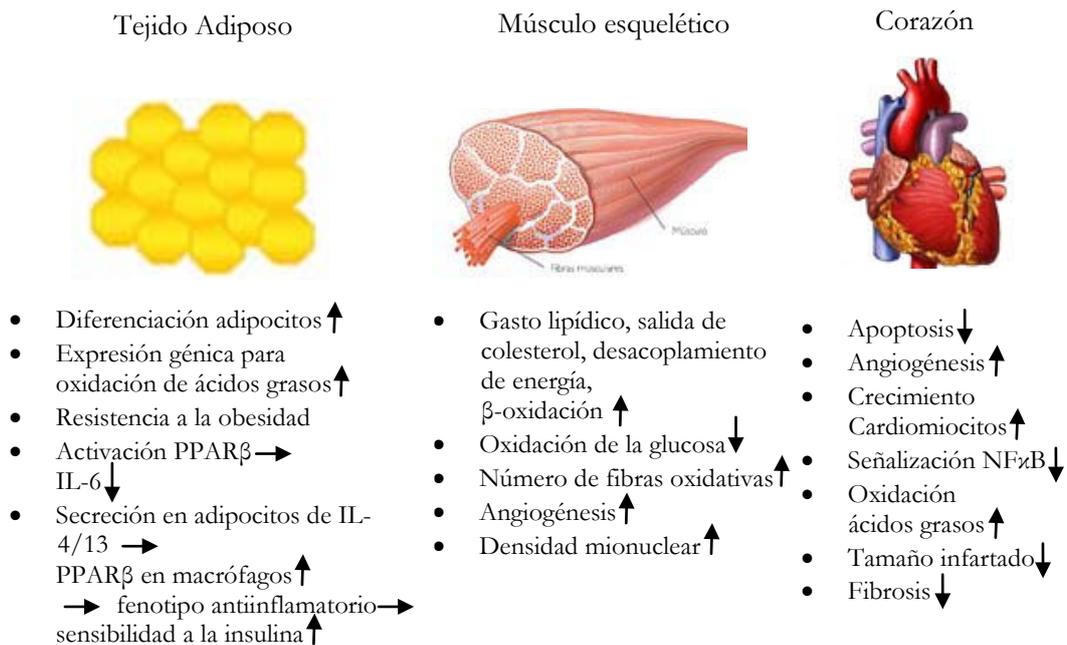


Figura 7. Esquema de las acciones de PPARβ relacionadas con el metabolismo en tejido adiposo, músculo esquelético y corazón.

-PPARβ y células vasculares.

PPARβ se expresa en células endoteliales, células del músculo liso vascular, fibroblastos cardíacos y macrófagos.

1. Células endoteliales.

La activación de PPARβ mejora la hipertrofia cardíaca *in vitro* (Sheng *et al.*, 2008), protege las HUVECs de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (Jiang *et al.*, 2009) pero, paradójicamente, induce la proliferación de células endoteliales y origina angiogénesis (Piqueras *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008).

Si la activación de PPARβ induce apoptosis (Bishop-Bailey y Hla, 1999) o previene la apoptosis es un tema controvertido y podría depender del tipo celular

y el estímulo utilizado para promoverla experimentalmente en cultivos de células endoteliales (Liou *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2008). Un efecto proapoptótico en células endoteliales de corazón *in vivo* es improbable, ya que en ratones tratados con el agonista sintético GW0742 ó GW501516 no se observó un incremento de muerte celular apoptótica (Wagner *et al.*, 2009). Se ha visto que GW501516 incrementa la proliferación y migración de cultivos de células endoteliales, lo que se asocia a un incremento en la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) y de la proteína relacionada a la diferenciación adiposa (ADRP, *Adipose Differentiation Related Protein*). Todos estos efectos son bloqueados en células endoteliales transfectadas con el dominio negativo de PPAR β (Piqueras *et al.*, 2007), indicando por tanto la especificidad de estos efectos. También, la activación de PPAR β con GW501516 ó L165041 en células endoteliales progenitoras incrementa la proliferación, migración, y protege frente a la apoptosis inducida por hipoxia (Han *et al.*, 2008a, b, c). Estos cambios son atribuidos a la activación de la vía PI3K/AKT.

La inflamación se asocia con un aumento de la vasodilatación local causada por la dilatación de las arteriolas, acompañado de un aumento de la permeabilidad vascular y la activación de las células endoteliales de vénulas postcapilares para expresar moléculas de adhesión. Esta combinación de flujo alterado y una mayor adherencia es crítica para el reclutamiento de leucocitos a los sitios de inflamación. Al igual que agonistas PPAR α y PPAR γ , ligandos selectivos de PPAR β (L165041, GW0742 y GW501516) inhiben las principales respuestas inflamatorias en la célula endotelial, involucradas en el reclutamiento de leucocitos, tanto *in vitro* (Rival *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2008; Piqueras *et al.*, 2009) como *in vivo* (Piqueras *et al.*, 2009).

Agonistas PPAR β inhiben la expresión de moléculas de adhesión proinflamatorias tal como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) y el oncogén regulador del crecimiento (GRO α , *Growth-Regulated Oncogene*) (Rival *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2008; Piqueras *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010).

PPAR β también protege a las células endoteliales del daño tisular provocado por el estrés oxidativo. La activación de PPAR β induce la proteína 14-3-3 α en las células endoteliales, que protege a las células de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (Liou *et al.*, 2006). También, se ha descrito que la activación de PPAR β incrementa la expresión de superóxido dismutasa-1, catalasa y tiredoxina, sugiriéndose una respuesta coordinada antioxidante (Fan *et al.*, 2008).

2. Células músculo liso vascular.

PPAR β se expresa en las CMLV. Su expresión es inducida en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*), a través de la vía de señalización PI3K/AKT. Estudios iniciales utilizando sobreexpresión de PPAR β mostraron que la proliferación de las CMLV estaba incrementada (Zhang *et al.*, 2002). Sin embargo, L165041, un agonista selectivo de PPAR β , inhibe la proliferación y la migración de CMLV a través de la inhibición de la expresión de ciclina D1, inducida por PDGF, de la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4, *Cyclin-Dependent Kinase*) y por tanto de la progresión del ciclo celular (Lim *et al.*, 2009). En CMLV, GW501516 aumenta la expresión del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1, *Transforming Growth Factor*) y el efecto parece depender del PPAR β endógeno. TGF- β 1 es, probablemente, el responsable de la supresión de la expresión de MCP-1, inducida por IL-1 β y de la proliferación de CMLV (Kim *et al.*, 2008). En ratas, la administración de L165041 disminuye la formación de la capa neointima en arterias carótidas sometidas a angioplastia por balón (Lim *et al.*, 2008). Por tanto, agonistas sintéticos de PPAR β parecen tener propiedades antiproliferativas y antiinflamatorias en CMLV. Estos datos están de acuerdo con estudios previos en los que ha aumentado la producción del ligando endógeno de PPAR β , PGI $_2$, mediante la sobreexpresión de la prostaciclina sintetasa, y se ha observado una inhibición de la proliferación de CML e hiperplasia de la capa íntima (Numaguchi *et al.*, 2004; Imai *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2002).

3. Fibroblastos.

Los fibroblastos expresan niveles moderados de PPAR β . Se ha descrito que el agonista GW501516 disminuye, de una forma concentración dependiente, la expresión de colágeno tipo II, inducida por Ang II y la síntesis de colágeno en cultivos de fibroblastos (Zhang *et al.*, 2007). Este efecto es evidente tanto en condiciones patológicas asociadas a un incremento de Ang II como en ratones wild-type tratados con agonistas específicos de PPAR β (Wagner *et al.*, 2009). Estos estudios sugieren que PPAR β podría ser una diana terapéutica prometedora en la fibrosis miocárdica y en la aterosclerosis al mejorar la estabilidad de la placa aterosclerótica.

4. Macrófagos.

La infiltración de macrófagos en la pared vascular juega un papel importante en la aterogénesis. PPAR β se expresa en macrófagos. En los últimos años, el papel de PPAR β en los macrófagos se ha estudiado ampliamente, obteniéndose resultados contradictorios. Oliver Jr y colaboradores (2001) observan que el GW501516 en una línea celular humana de monocitos incrementa la expresión de los transportadores de membrana dependientes de ATP (ABCA1, *Cholesterol transporter ATP-Binding Cassete A1*) y el eflujo de colesterol mediado por Apolipoproteína A1. Sin embargo, Vosper y colaboradores (2001) encontraron que un agonista diferente de PPAR β , el compuesto F, incrementaba la acumulación lipídica tanto en cultivos primarios de macrófagos humanos como en la línea celular THP-1. El compuesto F aumentaba la expresión de genes involucrados en la captura y almacenamiento de lípidos como los receptores depuradores (SRA y CD36), pero reprimía, a su vez, genes diana en el metabolismo lipídico y eflujo de colesterol como la Apolipoproteína E y la colesterol 27-hidroxilasa. En macrófagos de ratón, ni la deficiencia genética de

PPAR β ni el tratamiento con agonistas, GW501516 ó GW0742, influían significativamente en el eflujo o acumulación de colesterol (Li *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). En conjunto, estos resultados sugieren que PPAR β no afecta al metabolismo del colesterol en ratones. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para establecer el papel de este receptor nuclear en el metabolismo del colesterol en macrófagos humanos.

Los agonistas PPAR β también presentan un potente efecto antiinflamatorio en macrófagos. En macrófagos peritoneales de ratón, el agonista GW0742 inhibe la expresión, inducida por el lipopolisacárido, de COX-2 y de la níttrico sintetasa inducible (iNOS) (Pasceri *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2003). Barish y colaboradores describen que el agonista GW501516 en macrófagos de ratón suprime la inducción genética de MCP-1, -3 y -5 por IL-1, interferón- γ (IFN- γ) y éster de forbol. El tratamiento con el agonista también inhibe la migración transendotelial de células THP-1 (Barish *et al.*, 2008). En macrófagos deficientes del receptor, el agonista no presentaba ningún efecto antiinflamatorio (Lee *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros tipos celulares como células epiteliales, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos, el agonista PPAR β no inhibe los procesos inflamatorios, indicando que el efecto es específico de un tipo celular (Trifilieff *et al.*, 2003).

-PPAR β y enfermedades cardiovasculares.

a) Aterosclerosis.

La enfermedad vascular aterosclerótica es una de las principales causas de mortalidad en el mundo occidental. Se trata principalmente de una enfermedad inflamatoria caracterizada por concentraciones plasmáticas elevadas de colesterol, particularmente de LDL.

Hasta la fecha, varios estudios, con distintos enfoques, han descrito el papel de PPAR β en la aterosclerosis en distintos modelos de ratón. Lee y colaboradores (2003) transplantaron células progenitoras de médula ósea deficiente en PPAR β

en ratones deficientes en el receptor de LDL (LDLR^{-/-}). Imprevisiblemente, la transferencia de macrófagos deficientes en PPAR β resultó en un menor grado de aterosclerosis, sugiriéndose que el PPAR β endógeno podría ser proaterogénico. Aunque estudios de sobreexpresión o supresión de PPAR β en macrófagos sugieren que PPAR β es proinflamatorio, el agonista GW501516 disminuye MCP-1, presentando por tanto un efecto opuesto (Lee *et al.*, 2003). Para explicar esta contradicción, se ha postulado un mecanismo transcripcional dependiente de ligando no convencional, donde PPAR β puede cambiar de “proinflamatorio” a “antiinflamatorio”: en la ausencia de ligando, PPAR β secuestra al represor transcripcional de respuestas inflamatorias, la proteína 6 del linfoma de células B (BCL-6, *protein B Cell Lymphoma*), permitiendo la inducción de genes proinflamatorios; sin embargo, en presencia del ligando, PPAR β libera al represor, el cual es libre para exhibir sus efectos antiinflamatorios. Siguiendo este enfoque de pérdida de función, dos estudios independientes analizaron el efecto del agonista GW0742 sobre la aterogénesis en ratones LDLR^{-/-} alimentados con una dieta rica en colesterol, alcanzando resultados divergentes. En el primer estudio, Li y colaboradores (2003) encontraron que el tratamiento, durante 14 semanas, con GW0742 (5 mg/Kg/día) disminuía la expresión génica de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en las lesiones ateroscleróticas sin alterar la progresión de la aterosclerosis. Por el contrario, Graham y colaboradores (2005) utilizaron ratones hembras LDLR^{-/-} alimentados con una dieta que inducía niveles moderados de hipercolesterolemia y observaron que GW0742 a dosis más altas (60 mg/Kg/día) reducía el tamaño de la lesión después de 10 semanas de tratamiento. Las discrepancias entre estos dos estudios podrían deberse a las diferencias en los niveles de hipercolesterolemia, el sexo y las dosis utilizadas. En general, estos datos sugieren que los agonistas PPAR β tienen efectos antiinflamatorios *in vivo*, pero no son suficientes para inhibir el desarrollo de la aterosclerosis en animales hipercolesterolémicos. Recientes publicaciones corroboran esta idea. GW501516, con una alta capacidad para modificar el perfil

lipídico, se ha descrito que posee una potente actividad antiateroesclerótica en ratones apoE^{-/-}.

Barish y colaboradores (2008) demuestran que GW501516 reduce significativamente las lesiones ateroscleróticas junto con un incremento de los niveles de HDL y una reducción en la expresión de citocinas en aorta y macrófagos. Además, en un modelo de aterosclerosis acelerado con Ang II (LDLR^{-/-}), se confirma el efecto ateroprotector de GW0742 (Takata *et al.*, 2008). Después de 4 semanas de tratamiento, GW0742, a las dosis de 1 y 10 mg/kg/día, inhibe significativamente la inducción de aterosclerosis por Ang II sin alterar la presión arterial. Este efecto beneficioso se atribuye a sus propiedades antiinflamatorias ya que incrementa la expresión vascular de BCL-6 y de proteínas reguladoras de la señal acoplada a proteína G (RGS4 y 5, *Regulators of G protein-coupled Signaling*) en la arteria; y suprime la activación, inducida por Ang II, de p38 y ERK en macrófagos. No obstante, el efecto metabólico de GW0742 podría también contribuir al efecto ateroprotector ya que disminuye significativamente los niveles plasmáticos de insulina, glucosa, peptina y triglicéridos (Takata *et al.*, 2008).

El agonista PPAR β , GW501516, aumenta los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) en monos rhesus obesos resistentes a la insulina, al tiempo que reduce los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoprotein*), triglicéridos (TG) e insulina en ayunas (Oliver *et al.*, 2001). Otro agonista PPAR β , L165041, aumentó las HDL en pacientes obesos y ratones diabéticos (db/db), pero no afectó a los TG del plasma (Leibowitz *et al.*, 2000). Akiyama y colaboradores (2004) investigaron el metabolismo de las lipoproteínas en ratones PPAR β ^{-/-} que carecen del dominio de unión al ligando del gen PPAR β murino (Peters *et al.*, 2000). Los ratones PPAR β ^{-/-} mostraron elevados niveles de TG plasmáticos y de ácidos grasos libres, pero no se modificaron los de colesterol total, colesterol libre y fosfolípidos alimentados con una dieta normal. Además los ratones PPAR β ^{-/-} tienen una mayor tasa de producción hepática de VLDL, así como una disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL, *LipoProtein*

Lipase) con un aumento de las proteínas hepáticas como angiopoyetina 3 y 4 en comparación con ratones silvestres.

b) Isquemia /reperfusión.

El daño en el miocardio originado por un proceso de I/R se encuentra significativamente reducido en ratones transgénicos PPAR β , lo que se ha atribuido a un incremento de la utilización de glucosa (Burkart *et al.*, 2007). El incremento en el transporte de glucosa, en animales transgénicos para PPAR β , está en desacuerdo con un estudio realizado en cardiomiocitos aislados donde no se observó efecto del agonista L165041 sobre el transporte de glucosa (Montessuit *et al.*, 2008).

Los efectos beneficiosos de PPAR β contra el daño cardíaco provocado por la I/R podrían ser atribuidos también a la prevención del incremento de la expresión de iNOS, y por tanto la disminución de la sobreproducción de NO (Agnetti *et al.*, 2005).

El papel beneficioso de los PPAR β sobre I/R no es exclusivo del corazón, también se ha descrito que protegen al riñón (Letavernier *et al.*, 2005), testículos (Minatoli *et al.*, 2009) y cerebro (Iwashita *et al.*, 2007) del daño de la I/R. Ratones PPAR β ^{-/-} sometidos a I/R cerebral, mostraron mayor tamaño infartado que los de tipo salvaje (Pialat *et al.*, 2007; Arsenijevic *et al.*, 2006). Este hallazgo se confirma por otro estudio que demuestra que la administración intracerebroventricular de los agonistas PPAR β , L165041 y GW501516, reduce significativamente el volumen infartado a las 24 horas de la reperfusión tras la isquemia cerebral en ratas (Iwashita *et al.*, 2007).

c) Hipertrofia cardíaca.

La activación farmacológica de PPAR β con GW0742 ó GW501516 en ratones salvajes rápidamente induce crecimiento de los cardiomiocitos y angiogénesis. A pesar del incremento en el diámetro de los cardiomiocitos no se acompaña de una modificación en la función del corazón. Aunque, en ciertos aspectos, los corazones de animales tratados con los agonistas se asemejan a los corazones de ratones sometidos a ejercicio voluntario durante un período largo. En 2009, Wagner y colaboradores identificaron como mecanismo de señalización, una activación transcripcional directa del gen de calcineurina por PPAR β . La calcineurina es identificada principalmente como un factor que induce hipertrofia patológica (Heineke y Molckentin, 2006), aunque también participa en el crecimiento cardíaco fisiológico (Bueno *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). Por tanto, parece ser que la activación farmacológica de PPAR β en el corazón, *in vivo*, incrementa los niveles de calcineurina y por tanto induce un crecimiento cardíaco fisiológico.

Se ha demostrado que los niveles de PPAR α y PPAR β están reducidos en la hipertrofia cardíaca (Planavila *et al.*, 2005a). Curiosamente, los cambios que provoca la hipertrofia cardíaca en la expresión de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos no se observaron cuando se inhibió la actividad de NF- κ B (Planavila *et al.*, 2005b). También, se ha demostrado que la delección de PPAR β en los cardiomiocitos en el corazón de ratones reduce la oxidación de ácidos grasos en el miocardio y la expresión del mRNA de genes implicados en este proceso, como PDK4, y conlleva a una miocardiopatía (Cheng *et al.*, 2004a).

PPAR β está muy expresado en el miocardio (Gilde *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004a), donde se ha observado la participación en la regulación transcripcional del metabolismo de los lípidos (Barger y Kelly, 2000). Se ha demostrado que ratones con cardiomiocitos específicos PPAR β ^{-/-} presentan una acumulación de lípidos en el miocardio, hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Cheng *et al.*, 2004b), lo que sugiere que PPAR β puede jugar un papel crucial en el mantenimiento de la

función cardíaca normal. Además, la activación *in vitro* de PPAR β , tanto con L165041 como con GW501516, inhibió la hipertrofia de cardiomiocitos de rata neonatal inducida por fenilefrina a través de la inhibición de NF- κ B (Planavila *et al.*, 2005b; Smeets *et al.*, 2008). Los resultados positivos de estos estudios preliminares son alentadores, pero se requiere una investigación más importante con el fin de determinar la función precisa de la activación PPAR β en la hipertrofia cardíaca.

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos

La resistencia a insulina se caracteriza por la disminución de la capacidad de la insulina para inhibir la síntesis de glucosa hepática o estimular la captación de glucosa por parte de tejidos periféricos, resultando en hiperglucemia, hiperinsulinemia y dislipidemia (Saltiel y Kahn, 2001; Taguchi y White, 2008; White, 2003). La resistencia a la insulina es clínicamente importante porque se asocia a varias enfermedades, incluyendo diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia así como con alteraciones en la fibrinólisis y coagulación sanguínea. Estos desórdenes son todos factores de riesgo independientes de enfermedad cardiovascular (infarto, ictus y enfermedad arterial periférica) (Boden G., 2011).

Los estados de resistencia a insulina están asociados con disfunción endotelial que, por consiguiente, contribuye a incrementar el riesgo de enfermedad vascular asociadas a estas condiciones. La alteración de la vía de señalización a la insulina en células endoteliales aminora el reclutamiento capilar de la insulina y su subsecuente liberación, resultando en una disminución de la captación de glucosa en el músculo esquelético (Kubota *et al.*, 2011). Una de las acciones principales de la insulina es estimular la producción del agente vasodilatador óxido nítrico (NO) del endotelio. Recientes estudios han descrito la ruta bioquímica de la señalización de insulina en el endotelio que regula la producción de NO (Vincent *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los PPAR β incrementan la oxidación de ácidos grasos y reducen la acumulación de lípidos en tejido adiposo y en otros tejidos (Lee *et al.*, 2006; Reilly y Lee, 2008). Además, estudios en roedores han demostrado que la activación de PPAR β reduce el peso corporal, incrementa la tasa metabólica y mejora la sensibilidad a la insulina, por incremento en la oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético (Wang *et al.*, 2003; Wang

et al., 2008). En ratones diabéticos homocigóticos db/db la activación prolongada de PPAR β mejora la sensibilidad a la insulina y mejora el perfil lipídico, sugiriendo que la activación de PPAR β podría ser una diana para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Winzell *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha descrito que la activación de los PPAR β mejora la señalización de la insulina en adipocitos estimulados con interleuquina-6 (Serrano-Marco *et al.*, 2011) y previene la resistencia a insulina inducida por ácidos grasos en células del músculo esquelético (Coll *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconoce si la activación de los PPAR β está relacionada con una mejora de la señalización de insulina en células endoteliales en condiciones de hiperglucemia.

Por lo tanto, ***el primer objetivo propuesto en esta Tesis Doctoral*** es: examinar el posible efecto protector de los agonistas PPAR β , GW0742 y L165041, sobre la alteración de la señalización de insulina inducido por alta glucosa en cultivos primarios de células endoteliales umbilicales humanas (HUVECs).

La disfunción endotelial juega un papel clave en la patogénesis de la enfermedad vascular diabética y es un factor de riesgo cardiovascular independiente de un mal pronóstico (Kamata *et al.*, 1989; De Vriese *et al.*, 2000; Jay *et al.*, 2005). Se ha sugerido que una elevada glucosa plasmática, LDL colesterol y especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen en la diabetes están implicados en el desarrollo de esta disfunción (Kobayashi y Kamata, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000). Por lo tanto, la relajación dependiente de endotelio y NO puede estar alterada en la diabetes por un exceso de generación de ROS como el O_2^- , que inactiva al NO (De Vriese *et al.*, 2000). Los niveles elevados de O_2^- son atribuibles principalmente a la activación de NADPH oxidasa dentro del sistema vascular (Jay *et al.*, 2005; Hink *et al.*, 2001; Guzik *et al.*, 2002; Sonta *et al.*, 2004) y/o a una disminución de los mecanismos de defensa antioxidantes, tales como la superóxido dismutasa (SOD) (Kamata y Kobayashi, 1996; Spitaler y Graier, 2002).

Los receptores activados por el activador de peroxisomas (PPARs) PPAR α , PPAR β , y PPAR γ son miembros de la superfamilias de receptores nucleares hormonales. Inicialmente se creía que los PPARs solo regulaban los genes involucrados en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Marx *et al.*, 2004). Sin embargo, múltiples evidencias sugieren que la activación de PPAR α o PPAR γ pueden ejercer efectos protectores cardiovasculares, además de sus efectos metabólicos (Leibovitz y Schiffrin, 2007), incluyendo una reducción de la presión arterial (Raji *et al.*, 2003; Diep *et al.*, 2002), reducción de la generación de ROS y mediadores pro-inflamatorios (Diep *et al.*, 2002) y restauración de la función endotelial (Kanie *et al.*, 2003; Majithiya *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2007; Olukman *et al.*, 2010). Curiosamente, PPAR α y PPAR γ son regulados a la baja en estados diabéticos y esto se asoció con un incremento de la expresión de mRNA de prepro-endotelina-1 (ppET-1) que puede desencadenar la disfunción endotelial (Kanie *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que agonistas

de PPAR γ pueden prevenir los efectos nocivos pro-inflamatorios vasculares de la ET-1 en la hipertensión (Montezano *et al.*, 2007).

La activación PPAR β , que se expresan de forma ubicua, también exhibe propiedades anti-inflamatorias en la pared del vaso mediante la inhibición de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) (Rival *et al.*, 2002). El agonista de PPAR β , GW0742 redujo la aterosclerosis en ratones deficientes del receptor LDL (LDLR^{-/-}) (Graham *et al.*, 2005), y atenuó substancialmente la aceleración de la aterosclerosis por angiotensina II y la inflamación arterial asociada (Takata *et al.*, 2008). Además, GW0742 mejoró la función endotelial en aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Esta mejora puede estar relacionada con una interferencia en la vía de señalización intracelular inducida por angiotensina II en la pared vascular (Zarzuelo *et al.*, 2011). La activación aguda de PPAR β también protegió del daño inducido por la isquemia/reperfusión en el riñón en ratas diabéticas (Collino *et al.*, 2011), y la activación crónica de PPAR β inhibió la nefropatía diabética inducida por streptozotocina (STZ) a través de mecanismos anti-inflamatorios (Matsushita *et al.*, 2011), sin alterar los niveles de glucosa en sangre.

Sin embargo, los posibles efectos protectores de la activación de PPAR β sobre la función endotelial no se han probado en un modelo animal de diabetes tipo 1. Nosotros hipotetizamos que el agonista altamente selectivo de PPAR β , GW0742 (Sznajdman *et al.*, 2003) podría mejorar la función endotelial en ratas diabéticas inducida por STZ.

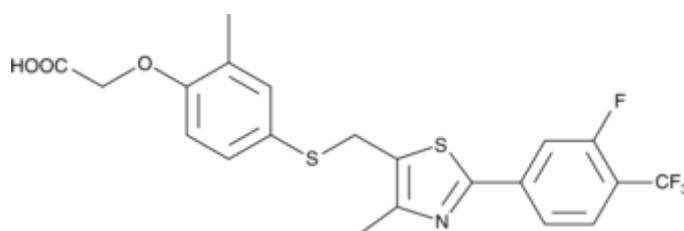
Por todo ello, ***el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral*** es analizar si el agonista PPAR β . GW0742, ejerce un efecto protector sobre la función endotelial en ratas diabéticas tipo 1.

Material y métodos.

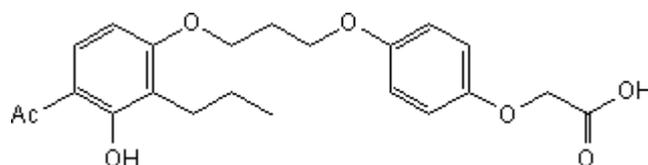
Material y métodos

1. Agonistas PPAR β objeto de estudio.

Para nuestro estudio hemos empleado dos agonistas sintéticos β PPAR derivados del ácido fenoxiacético: GW0742, que es un agonista potente y selectivo de PPAR β y L165041, que es un agonista potente y de baja selectividad.



GW0742, ácido 4 - [[[2 - [3-fluoro-4-(trifluorometil) fenil metil]]-4-metil-5-tiazolil] tio] - 2-metilfenoxi acético].



L165041, ácido (4-[3-{4-acetil-3-hidroxi-2-propilfenoxi}propoxil]fenoxi) acético.

2. Efectos de los agonistas PPAR β sobre la alteración de la señalización de insulina inducida por hiperglucemia.

2.1. Cultivo primario de células endoteliales.

Las células endoteliales fueron extraídas de la vena de cordones umbilicales humanos según la técnica descrita por Vargas *et al.*, 1994.

El aislamiento se realizó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. La vena umbilical se identificó y fue canalizada para posteriormente realizar un lavado extenso, con el objeto de retirar los restos de sangre. El lavado se realizó con solución salina fisiológica (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) más antibióticos (Penicilina/Estreptomicina 2 mM y Anfotericina B 2 mM). Después se obturó uno de los extremos con bridas de plástico estériles y la vena fue llenada con una solución de colagenasa al 0,1 % e incubada durante 30 minutos a 37 °C.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se vació el contenido de la vena sobre un tubo de centrifuga estéril de 50 mL presionando suavemente y longitudinalmente con los dedos para facilitar el desprendimiento de las células endoteliales del lecho vascular tratado con colagenasa. Seguidamente, se perfundió la vena con medio de cultivo M199 suplementado con 20 % de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) para lavar la vena y recogerlo en el mismo tubo de centrifuga.

Posteriormente se obtuvieron las células HUVEC por centrifugación durante 5 minutos a 500 g. El sobrenadante fue descartado y las HUVEC fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco (M199 + 20 % FBS + 2 mM penicilina/estreptomicina + 2 mM anfotericina B + 2 mM de glutamina + 10 mM

HEPES + 30 mM suplemento de crecimiento de células endoteliales + 100 mM heparina) y sembradas en frascos de cultivo pre-tratados con gelatina al 0,2 %. Posteriormente fueron incubadas en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C, y fueron caracterizadas por su crecimiento en monocapa y por inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra el factor de von Willebrand.

Los pases de las células utilizadas en todos experimentos estaban comprendidos entre 2 y 5, las células fueron mantenidas en medio libre de FBS durante dos horas antes de los experimentos. Las HUVECs fueron incubadas con los agonistas de PPAR β , GW0742 ó L165041 (1 ó 10 μ M) o el agonista de PPAR α , clofibrato (1 μ M), o el agonista de PPAR γ , ciglitazona (1 μ M), o el inhibidor de ERK1/2, PD98059, o el inhibidor de JNK, SP600125 (25 μ M), durante 24 horas en medio bajo (5 mM) o alto (30 mM) en glucosa. Las células fueron usadas para medir la producción de NO por DAF-2, o para determinar por western blot la fosforilación de eNOS y Akt, en condiciones basales y de estimulación con insulina (500 nM durante 30 minutos). En algunos experimentos, las células fueron co-incubadas con el antagonista de PPAR β , GSK0660 (1 μ M) 1 hora previa a la adición de cada agonista de PPAR β .

2.2. Transfección de PPAR β siRNA.

Las células HUVECs con una confluencia del 80% fueron tripsinizadas y colocadas en placas de 6 pocillos en M199 y suplementado con 10% de SFB. El medio fue cambiado el día de la transfección, a cada pocillo se le adicionaron 900 μ L de M199 sin FBS ni antibióticos (confluencia del 60-80%). Se prepararon 2 tubos (1 y 2) por placa y a cada tubo se le añadieron 50 μ L de M199; a uno de los tubos (1) se le añadieron 3,5 μ L de Lipofectamine siRNAiMAX (Invitrogen) (RNA de interferencia), y al otro tubo (2) 2,5 μ L de PPAR β -específico siRNA de Dharmacon. Para los controles se realizó el mismo procedimiento, a un tubo (1)

se le adicionó 3,5 μL de Lipofectamine siRNAiMAX y al otro (2) 2,5 μL de siRNA control de Dharmacon. Los tubos fueron agitados suavemente y se dejaron en reposo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a mezclar el tubo (1) con Lipofectamine y el tubo (2) con siRNA (control o PPAR β -específico) durante 20 minutos a temperatura ambiente hasta la formación de los complejos. Tras los 20 minutos añadimos la mezcla gota a gota (100 μL) a la placa correspondiente la cual previamente contiene 900 μL de M199 sin SFB y antibióticos, posteriormente se agitó suavemente y se llevó al incubador durante 4 horas; transcurrido este tiempo se retiró el medio, realizando dos lavados con M199 (con SFB y antibióticos) y finalmente se añadieron 1000 μL de este medio y se incubó durante 48 horas.

La expresión de mRNA del PPAR β fue determinada por RT-PCR después de 48 horas post-silenciamiento y comparada con su respectivo control siRNA para determinar la eficiencia. Además, la expresión proteica del receptor fue medida por western blot transcurridas 48 horas del silenciamiento.

Tras la 48 horas, las células fueron tratadas con baja (5 mM) y alta (30 mM) glucosa y co-incubadas con L165041 (10^{-5} M) ó GW0742 (10^{-5} M) durante 24 horas y en presencia o ausencia del antagonista de PPAR β , GSK 0660 (10^{-6} M) y posteriormente se cuantificó el NO liberado tras la estimulación de 100nM de insulina, o la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

2.3. Cuantificación de NO liberado por diaminofluoresceína-2 en HUVECs.

La cuantificación de NO liberado por HUVEC se realizó con la sonda fluorescente sensible al NO, diaminofluoresceína-2 (DAF-2), un compuesto que se introduce en la célula como diacetato liposoluble (muy permeable), que una vez en el interior celular disminuye su permeabilidad debido a la acción de las

esteretasas. El DAF-2 reacciona con el NO para producir triazolofluoresceína (DAF-2T) altamente fluorescente, como se describió previamente en Leikert *et al.*, 2001.

Las células fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 96 pocillos, y la heparina y el factor de crecimiento celular endotelial se omitieron las 24 horas antes de la estimulación. Las células se lavaron con PBS y se pre-incubaron con medio bajo (5 mM) y alto (30 mM) en glucosa durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas las células fueron lavadas con PBS y posteriormente pre-incubadas con L-arginina (100 μ M) 5 minutos. En algunos experimentos, el L-NAME fue añadido 15 minutos, antes de la adición de L-arginina.

Posteriormente, se incubaron con DAF-2 (10^{-7} M) y se estimularon bien con el ionóforo de calcio calimicina (A23187, 1 μ M) o Insulina (100 nM), en la oscuridad a 37 °C. A continuación, la fluorescencia se midió a los 0, 5, 15 y 30 minutos, respectivamente, con un espectrofluorímetro (Fluorostart, Labtechnologies BMG, Offenburg, Alemania), con una longitud de onda de excitación fija en 495 nm y la de emisión de 515 nm. La fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada de cada valor. En algunos experimentos, las células fueron co-incubadas con el antagonista de PPAR β , GSK 0660 (1 μ M) y/o el quelante de calcio intracelular BAPTA-AM (10 μ M) o el inhibidor de la PI3K, LY-294002 (10 μ M).

2.4. Expresión proteica en HUVECs.

Los experimentos se realizaron en células entre los pases 2 y 5. Para evaluar el grado de fosforilación de la proteína kinasa B (p-Akt) (Ser-473), p-eNOS (Ser-1177), p-AMPK (Thr-172), p-ERK1/2 (Thr183 y Tyr 185), receptor del sustrato de insulina (p-IRS-1) (Ser-636), Akt, eNOS, AMPK y ERK1/2, a las células se les

indujo un estado de no proliferación mediante la privación de factores de crecimiento y heparina durante 24 horas.

Después de este período, las células se lavaron con PBS y se homogeneizaron.

La composición del tampón de homogeneización (pH 8) fue (en mM): ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil]-etanosulfónico (HEPES) 50, NaCl 150, pepstatina 500, leupeptina 5, Na₃VO₄ 10, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, *PhenylMethaneSulfonyl Fluoride*) 100, ácido okadaico 0,01 y tritón al 1 %.

Los western blot se realizaron con 30 µg de proteína. Las proteínas fueron previamente determinadas por el ensayo del ácido bicinónico (BCA, *bisinchonic acid disodium salt hydrate*) (Walker *et al.*, 1994). Las proteínas fueron entonces suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante calor durante 5 minutos a 95 °C.

Para electroforesis se utilizó un gel de dodecilsulfato sódico (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*)-poliacrilamida al 8 % y se realizó en un sistema minigel (Bio-Raid Laboratorios, Hercules, California, EE.UU.). Después, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, *PolyVinylidene Fluoride*) y se incubaron con tampón de bloqueo (tampón Tris salino tamponado al 0,1 % de Tween 20 (TBS-T) con leche desnatada en polvo al 5 %) durante 2 horas. Luego las membranas fueron lavadas durante 15 minutos con TBS-T, cambiando la solución cada 5 minutos. Posteriormente, fueron incubadas con su respectivo anticuerpo primario (monoclonal de conejo anti-fosfo-AKT-ser-473 y monoclonal de conejo anti-AKT, policlonal de conejo anti-fosfo-eNOS-ser-1177, monoclonal de ratón anti-eNOS, monoclonal de conejo anti-fosfo-AMPKα-Thr¹⁷², policlonal de conejo anti-AMPKα, policlonal de ratón anti-fosfo-ERK1/2, policlonal de conejo anti-ERK1/2 y policlonal de conejo fosfo-IRS-1-Ser-636 (dilución 1:1000) durante toda la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron de nuevo durante 15 minutos con TBS-T cambiando cada 5 minutos la solución, y se incubaron con anticuerpo secundario caprino anti-ratón conjugado con

peroxidasa para eNOS y caprino anti-conejo para AKT, ERK1/2 y AMPK α diluido en TBS-T al 5 % de leche en polvo desnatada (1:2500). Las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras lavar de nuevo las membranas de la forma anteriormente descrita, la unión del anticuerpo a la proteína se detectó mediante su incubación durante un minuto con un sistema ECL (Amersham Pharmacy Biotech, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) y una película auto radiográfica para ver la quimioluminiscencia. Las películas se escanearon y se realizó en estas imágenes un análisis densitométrico usando el software Scion Image-Release Beta 4.02. (<http://www.scioncorp.com>). Las membranas fueron recicladas para determinar la expresión de la proteína fosforilada de cada muestra. Se calculó la relación entre la intensidad de banda para AKT, eNOS, AMPK α y ERK1/2 y su correspondiente proteína fosforilada de cada muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de dicha relación de cada grupo con respecto al grupo control.

Para determinar la expresión proteica de PPAR β , transcurridas 48 horas post-silenciamiento las células fueron lavadas, recogidas y centrifugadas a 15.000 x g a 4°C durante 30 minutos para producir el extracto completo. El contenido de proteínas se determinó por el método Bradford. Las muestras se desnaturalizaron, se sometieron a SDS-PAGE usando un gel de corrida al 10%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 3% de BSA en TBS, y después se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo correspondiente de PPAR β siguiendo las recomendaciones del fabricante (Abcam, Cambridge, UK). Las transferencias se lavaron con un tampón de lavado (TBS 0,1% Tween 20) tres veces durante 15 minutos cada vez. Se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo secundario unido a HRP anti-conejo IgG (Cell Signaling Technology) y se desarrollaron llevando a cabo un procedimiento de ECL, tal como se especifica por el fabricante (GE Healthcare, Buckingham, UK).

2.5. Expresión de diferentes genes mediante PCR.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa en tiempo real se utilizó para analizar la expresión de mRNA de distintos genes. Para analizar la expresión génica mediante el RNA total fue extraído mediante homogenización de los anillos aórticos y posteriormente convertido en DNA complementario (cDNA, *complementary DNA*) por métodos estándar.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con un termociclador Techne Techgene (Techne, Cambridge, UK). La técnica RT-PCR se utilizó para analizar la expresión de mRNA de PPAR β y el gen diana de PPAR β , PDK-4 (véase Tabla 3).

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando Syber Green con ROX como fluoróforo de referencia (i^{Taq}™ SYBR® Green Supermix with ROX sample, Biorad laboratorios, California, EE.UU.), a partir del cDNA ya extraído. El gen de referencia elegido fue β -actina y su expresión fue empleada como control de carga en los distintos experimentos.

La acumulación de copias del molde de DNA que se produce a medida que avanzan los ciclos de PCR provoca que también se incorporen más moléculas de fluorescencia. La acumulación de esas moléculas permite determinar el número de ciclo en el que se inicia la fase exponencial de la PCR. Este ciclo inicial depende directamente de la cantidad de molde de DNA inicial que había en la muestra usada para la reacción de PCR. Cuánta más cantidad de molde haya en una muestra más bajo será el valor del ciclo inicial. El equipo usado (*Stratagene, Mx3005*) incluye la programación informática necesaria para calcular el valor del ciclo inicial y también permite identificar la especificidad del producto amplificado mediante el análisis de las curvas de fusión.

Se hace aumentar la temperatura a una velocidad lenta hasta llegar a una temperatura final de 95 °C y se ordena al aparato que recoja en todo momento la fluorescencia que emiten las moléculas *SYBR Green*. En el momento en que la temperatura de incubación coincida con la temperatura de desnaturalización del producto amplificado se producirá la separación de la doble cadena de DNA. Esta separación provoca la pérdida de emisión de fluorescencia de las moléculas *SYBR Green* y por lo tanto una caída en la cantidad de fluorescencia que recoge el aparato. Esta temperatura es específica para cada fragmento de DNA de doble cadena y permite identificar el número de productos amplificados en la reacción de PCR.

La cuantificación se realizó utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ (*Cycle threshold*, ciclo umbral).

2.6. Medida de la concentración de ROS intracelular.

La sonda fluorescente 2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína, acetil ester (CM-H2DCFDA) se utilizó para determinar la generación de ROS intracelular en las células endoteliales. Este reactivo entra en las células y reacciona con ROS para generar el compuesto fluorescente 2', 7'- diclorofluoresceína. Las HUVECs confluentes en placas de 96 pocillos se cultivaron en condiciones de 5 ó 30 mM de glucosa, en presencia o en ausencia de L165041 (1 μ M), o el inhibidor del complejo I, rotenona (5 μ M), o el inhibidor del complejo II, tenoiltrifluoroacetona (TTFA 10 μ M), o el desacoplador de fosforilación oxidativa, carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP 0,5 μ M) durante 24 horas. Se añadieron inhibidores (GSK0660 1 μ M, o DCA 10 μ M) 30 minutos antes de la incubación con L165041. Posteriormente, las células se incubaron con 5 mM de CM-H2DCFDA durante 30 minutos a 37°C. Después de la retirada del medio y lavado de las células, la intensidad de la fluorescencia (unidades relativas

de fluorescencia) se midió a una longitud de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente, usando un espectrofluorímetro (Fluorostart, BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany).

2.7. Reactivos.

GW0742, L165041 y GSK0660 fueron adquiridos de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

El Medio 199 y HEPES se obtuvieron de Lonza (Verviers, Bélgica). Los anticuerpos de conejo anti-fosfo-eNOS-ser-1177, ratón anti-eNOS, conejo anti-fosfo-AKT-ser-473, conejo anti-AKT, conejo anti-ERK1/2, monoclonal de conejo anti-fosfo-AMPK α -Thr¹⁷² y policlonal de conejo anti-AMPK α de Cell Signalling Technology, Massachusetts, EE.UU. Los anticuerpos de conejo anti-p47^{phox}, conejo anti-fosfo IRS-1-Ser 636 y los anticuerpos de peroxidasa secundarios conjugados de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.). El anticuerpo de ratón anti-fosfo-ERK1/2 de Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

El sistema de electroquimioluminiscencia fue de Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, Reino Unido). El resto de los productos fueron obtenidos de Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

La Lipofectamine siRNAiMAX de Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), PPAR β -específico siRNA de Dharmacon (Lafayette, Colorado, EE.UU.), y siRNA control Dharmacon (Lafayette, Colorado, EE.UU.).

2.8. Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm error estándar de la media (S.E.M., standard error of the mean) y n refleja el número de experimentos

realizados. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos fueron calculadas por un análisis de varianza (ANOVA), seguido por una prueba de Newman-Keuls. $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

3. Efectos del agonista de PPAR β , GW0742, sobre la disfunción endotelial de ratas diabéticas tipo 1.

3.1. Animales y grupos experimentales.

Se utilizaron ratas macho Wistar de 280 - 320 gramos obtenidas de Harlan Laboratories S.A. (Barcelona, España). Fueron mantenidas en el animalario cinco ratas por batea, con libre acceso a una dieta estándar y agua, a una temperatura constante de 24 ± 1 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos se realizaron conforme a la Guía para el Cuidado y el Uso de los Animales de Laboratorio (*National Institutes of Health*, NIH; publicación n° 85 - 23, revisada en 1996) y fueron aprobados por nuestro Comité Institucional para el cuidado ético de los animales.

Los animales se repartieron de forma randomizada en cuatro grupos:

- a) Control (vehículo, 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=10.
- b) Control tratadas (GW0742, 5 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=10.
- c) Diabéticas (vehículo, 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=10.
- d) Diabéticas tratadas (GW0742, 5 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=10.

Las ratas fueron diabetizadas con una única dosis de STZ, 2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos) (50 mg Kg⁻¹ disuelto en buffer citrato a pH 4,5) administrada vía endovenosa en la cola. A las ratas controles se les administró el buffer. Tres días después de la inyección de STZ, los niveles de glucosa plasmática fueron determinados en ratas en ayunas durante 18 horas usando el glucómetro Accu-Check Aviva (Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España). Fueron consideradas como diabéticas aquellas ratas con niveles plasmáticos de glucosa iguales o superiores a 200 mg dL⁻¹ (Camici et al., 2007) y poliuria. El tratamiento con GW0742 se inició tres días después de la inyección con STZ o con el buffer de citrato.

El fármaco se administró mediante sonda gastroesofágica diariamente durante las 5 semanas de tratamiento. GW0742 es un potente y selectivo agonista PPAR β con un valor de dosis eficaz 50 (DE50) de 50 nM para PPAR β . La concentración plasmática de GW0742 no se determinó en el presente estudio, sin embargo, ratones tratados con GW0742 a una dosis de 1 y 10 mg/Kg durante 4 semanas mostraron concentraciones plasmáticas de 0,4407 μ M y 2,270 μ M, respectivamente (Takata *et al.*, 2008) y ratones deficientes en el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDLR -/-, *Low Density Lipoprotein Receptor*) tratados con 6 mg/Kg durante 16 semanas mostraron concentraciones en el rango de 0,805-1,250 μ M (Graham *et al.*, 2005). De hecho, la concentración plasmática del agonista a la dosis de 5 mg/Kg se espera que active específicamente al receptor PPAR β sin que exista reactividad cruzada con otras isoformas de PPAR, ya que los niveles esperados (< 2,210 μ M) estarían por debajo del valor de DE50 de PPAR α murino (8,9 μ M) y PPAR γ (> 10 μ M) (Graham *et al.*, 2005).

Durante el período experimental las ratas tuvieron libre acceso a comida y agua. El peso corporal y la presión arterial se controlaron semanalmente.

3.2. Medida de la presión arterial.

Mediante registro indirecto se midieron la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial media (PAM), además de la frecuencia cardíaca (FC). Dichos datos fueron determinados semanalmente 18-20 horas después de la administración del fármaco en ratas conscientes, aisladas y precalentadas (37 °C), mediante pletismografía en la cola (Navarro-Cid *et al.*, 1995) (Digital Pressure Meter LE 5001, Letica S.A., Barcelona, España). El medidor de presión LE 5001 es un equipo basado en microprocesador, específicamente diseñado para medir de modo no invasivo la presión arterial en animales. El sistema se basa en un circuito neumático de presión variable que es detectada mediante un transductor de presión y mostrada en la pantalla del equipo. El método usado para tomar la presión se basa en la técnica de esfigomanometría usada para medir la presión arterial en humanos. De ahí que el equipo conste de un manguito, cuya misión es ocluir el paso de la sangre en un vaso sanguíneo y un transductor que detecta los pulsos. Transductor y manguito se fijan a la cola del animal para trabajar en la arteria caudal. El LE 5001 mide la FC en latidos por minuto (lpm), los valores de PAS o máxima presión, PAD o mínima y la media calculada como:

$$PAM = PAD + 0,33 (PAS-PAD)$$

Se realizaron del orden de quince determinaciones en cada sesión y se tomó como dato la media aritmética de los 10 valores más semejantes, con una diferencia no mayor de 5 mmHg.

3.3 Parámetros morfológicos.

Al finalizar el período experimental, los animales fueron anestesiados con 2,5 mL/Kg de equitensina i.p. (pentobarbital al 1%, hidrato cloral al 4%). Se realizó una incisión en el abdomen para visualizar y tener acceso a la aorta abdominal, a través de la cual se extrajo la sangre utilizando un jeringa heparinizada. Posteriormente se obtuvo el plasma mediante centrifugación de la sangre a 3000 r.p.m durante 10 minutos. El plasma se alicuotó y se almacenó a - 80 °C hasta su utilización.

Seguidamente tras la exanguinación de los animales, se extrajeron los riñones, la aorta torácica y el corazón. A excepción de la aorta, que se utilizó inmediatamente para las pruebas de reactividad vascular que se describirán con detalle más adelante, estos órganos se lavaron en solución de Krebs fría y se secaron para ser pesados. Tras pesar el corazón se eliminaron las aurículas y el ventrículo derecho, para quedarnos con el ventrículo izquierdo limpio, que se pesó de nuevo.

Mediante los datos de peso de estos órganos, y el peso de cada animal antes de su sacrificio, calculamos los diferentes índices morfológicos, dividiendo el peso del órgano en cuestión por el peso del animal, en gramos, y multiplicado por 100 para obtener el %. Así se obtuvieron el Índice de peso cardíaco (I.P.C.), Índice de peso del ventrículo izquierdo (I.P.V.I.), Índice de peso del hígado (I.P.H) e Índice de peso renal (I.P.R.) de cada animal para su posterior análisis estadístico.

El índice de Fulton fue calculado dividiendo los pesos del ventrículo derecho/ventrículo izquierdo + septum.

Los órganos fueron divididos, congelados en nitrógeno líquido y almacenados a - 80 °C para su posterior utilización.

3.4. Determinaciones en plasma.

3.4.1. Glucosa, triglicéridos, HDL y colesterol.

Las concentraciones plasmáticas de glucosa, triglicéridos, HDL y colesterol total se determinaron por métodos colorimétricos utilizando kits Spinreact (Spinreact, S.A., España).

3.4.2. Peroxidación lipídica.

El contenido en malonildialdehído plasmático (MDA) se evaluó como se describe en Duarte y colaboradores (2001).

Se hicieron reaccionar en un eppendorf mantenido en hielo, 100 µl de plasma de muestra (obtenidos previamente por centrifugación durante 10 minutos a 3000 r.p.m. de la sangre extraída de cada rata al ser sacrificada y congelados inmediatamente y conservados a - 80 °C), con 250 µl de reactivo cromogénico (solución de 1-metil-2-fenilindol 1,03 mM en acetonitrilo) y 75 µl de ácido clorhídrico al 35 % (v/v), agitando cada eppendorf.

La mezcla se incubó durante 40 minutos en un baño a 45 °C, y posteriormente se volvió a mantener en hielo, para ser centrifugada a 4 °C durante 15 minutos a 14000 r.p.m. Posteriormente, en una placa de 96 pocillos, se cargaron 100 µl de cada mezcla y se midió su absorbancia a 586 nm en un lector de placas (Microplate Reader Model 680XR, Bio-Rad). El cálculo del contenido de MDA se realizó mediante la interpolación de los valores obtenidos con una curva patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano.

3.4.3. ET-1.

Los niveles plasmáticos de ET-1 se determinaron con un kit comercial (R&D Systems, Mineapolis, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1 mL de plasma y los resultados se expresaron en pg de ET-1/mL de plasma.

3.5. Estudios de reactividad vascular.

Los estudios de reactividad vascular ex vivo se han realizado en aorta torácica y arteria mesentérica.

3.5.1. Aorta torácica.

La aorta torácica fue cuidadosamente extraída desde el diafragma hasta el cayado aórtico y depositada en una placa Petri que contenía solución de Krebs (con una composición en mM de: NaCl 118; KCl 4,75; NaHCO₃ 25; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 2; KH₂PO₄ 1,2 y glucosa 11; pH 7,5). Seguidamente, se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y adiposo adheridos a la aorta y ésta se dividió en segmentos de unos 3 mm de longitud.

Las pruebas se llevaron a cabo en anillos de aorta torácica en los cuatro grupos de ratas experimentales.

3.5.1.1. Montaje de la preparación.

Los anillos aórticos se montaron en un sistema convencional de baño de órganos. Para ello se introdujeron en el lumen de dichos anillos dos alambres rígidos de acero inoxidable con forma de L, de 0,2 mm de diámetro, uno de los

cuales se fijó a la pared del baño y el otro podía desplazarse paralelo al anterior hacia arriba y abajo, conectando este último a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento (Letigraph 2000, Cibertec S.A., Madrid, España). Los cambios en la tensión del vaso fueron registrados y grabados [PowerLab 800 (AD Instruments, Cibertec)] (Sánchez *et al.*, 2007). Los baños de órganos contenían 5 mL de la solución de Krebs, mantenida a 37 °C y constantemente burbujeada con O₂ al 95 % y CO₂ al 5 % (gas carbógeno) para mantener un pH comprendido entre 7,3 y 7,4. Los anillos fueron sometidos a una tensión de 2 g y se dejaron estabilizar durante 60-90 minutos antes de la adición de los fármacos. Durante este periodo, la solución de Krebs se cambiaba cada 30 minutos y los anillos eran retensionados según las necesidades para mantener la tensión final estable de 2 g.

3.5.1.2. Protocolos experimentales ex vivo.

Para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación a ACh (10^{-9} - 10^{-5} M) añadida de forma acumulativa a los baños, en ausencia o presencia de L-NAME (10^{-4} M), en anillos pre-contraídos con Phe, para obtener una pre-contracción similar dentro de los grupos (10^{-6} M en el grupo control y en ambos grupos tratados con GW0742 y $3 \cdot 10^{-7}$ M en el grupo diabético). Los resultados se expresaron como % de relajación respecto a la precontracción inicial con Phe.

Con el fin de estudiar la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación a NPS (10^{-9} - 10^{-5} M) añadido a los baños de forma acumulativa. Este experimento se realizó en oscuridad, en anillos a los que se les eliminó previamente el endotelio, como se ha descrito con anterioridad, y pre-contraídos con Phe (10^{-6} M). Los resultados se expresaron como % de relajación respecto a la pre-contracción inicial con Phe.

3.5.2. Arteria mesentérica.

3.5.2.1. Montaje de la preparación.

También se realizaron estudios funcionales en arterias mesentéricas en un miógrafo isométrico (Multi Myograph System-610M Danish Myo Technology). Para ello, una vez aislada la tercera rama de la arteria mesentérica, fueron cortadas en segmentos de 1,7- 2 mm de longitud. Con la ayuda de las dos plataformas metálicas incluidas en el miógrafo, se introdujeron dos alambres de acero inoxidable (40 μm de diámetro) por la luz del segmento; uno de los alambres se fijó a un soporte móvil acoplado a un tornillo micrométrico (que permite modificar el grado de estiramiento del vaso) y el otro alambre se fijó a un segundo soporte acoplado a un transductor isométrico. Cada vaso se tensionó en función de su diámetro para la obtención de una presión transmural de 13.3 N/m².

3.5.2.2. Protocolos experimentales ex vivo.

3.5.2.2.a. Para evaluar la respuesta relajante a ACh, se realizaron también estudios en pequeñas arterias mesentéricas intactas pre-contraídas con Phe (10⁻⁵ M) en segmentos control, tratados con L-NAME o pre-contraídos con KCl 80 mM.

3.5.3. Experimento *in vitro* de reactividad vascular en aorta torácica.

Para evaluar el efecto de GW0742 sobre la disfunción endotelial inducida por alta glucosa se realizaron una serie de experimentos en anillos de aorta intactos los

cuales fueron montados en un sistema de baño de órganos, y mantenidos en solución de Krebs normal, después del ensayo de funcionalidad del endotelio con ACh, los anillos fueron incubados en un medio con baja (5 mM) o alta (44 mM) glucosa durante 6 horas en el baño de órganos, en presencia o ausencia de agonistas PPAR β , GW0742 (10^{-6} M) ó L165041 (10^{-6} M) y con o sin incubación previa de 1 hora con el antagonista específico de PPAR β , GSK0660 (10^{-6} M). Posteriormente, después del lavado de la preparación, la respuesta relajante a ACh fue estudiada en anillos pre-contraídos con fenilefrina. Esos anillos fueron congelados a -80 °C para posteriormente realizar RT-PCR cuantitativa.

3.6. Detección *in situ* del contenido vascular de ROS.

La detección *in situ* de la producción vascular de ROS se realizó mediante la técnica del dihidroetidio (DHE) (Lodi *et al.*, 2006). Utilizamos DHE para localizar ROS en secciones aórticas. El DHE entra en las células y es oxidado por ROS para formar etidio, que se une al DNA para producir una fluorescencia brillante de color rojo.

Los anillos de la aorta torácica fueron incluidos en OCT (Tissue-Tek® OCT Compound, Sakura) y congelados (- 80 °C). Posteriormente se realizaron cortes histológicos de cada anillo de 10 μ m en un criostato (Microm International Model HM500 OM), que se fijaron en portas con polilisina. Los cortes histológicos se llevaron a una cámara húmeda donde se incubaron en una solución de HEPES tamponada (en mM: NaCl 130; KCl 5; MgCl₂ 1,2; glucosa 10 y HEPES 10, ajustado a pH 7,3 con NaOH) durante 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a una nueva incubación con solución HEPES que contenía DHE (10^{-5} M) durante 30 minutos y en oscuridad. A continuación, las preparaciones se tiñeron con el marcador nuclear, dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,3 μ M), durante 5 minutos en cámara húmeda, a 37 °C aún en

oscuridad, posteriormente fueron lavadas con 1 mL de solución tamponada de HEPES dos veces y selladas con cubreobjetos.

Cuatro secciones de cada preparación fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia (Leica DM IRB, Wetzlar, Alemania) usando un objetivo de 40x con los siguientes pares de filtros de excitación/emisión: 340-380 nm/425 nm de longitud de onda para visualizar la fluorescencia azul del DAPI, 450-490 nm/515 nm para visualizar la autofluorescencia verde de la elastina y 540-30 nm/ 610-75 nm para visualizar la fluorescencia roja del etidio. Las secciones fueron fotografiadas con una cámara digital a color Leica DC300F, y las imágenes se grabaron para posterior análisis. Las condiciones de microscopio y cámara fueron mantenidas constantes para todas las preparaciones.

Las fluorescencias de etidio y DAPI fueron cuantificadas usando ImageJ (ver 1.32j, NIH, <http://rsb.info.nih/ij/>). La producción de ROS fue calculada de la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI. En experimentos preliminares algunas series de secciones se trataron con el “scavenger” de O_2^- tirón ($10 \mu M$) o el pegilado de superóxido dismutasa (PEG-SOD), $250 U mL^{-1}$) durante 30 minutos a $37^\circ C$ y posteriormente se incubaron con DHE.

3.7. Actividad vascular de la NADPH oxidasa.

La actividad de la NADPH oxidasa se cuantificó en anillos aórticos intactos mediante quimioluminiscencia con lucigenina, como se describió previamente por Ohara *et al.*, 1993. Se incubaron los anillos aórticos de todos los grupos experimentales durante 30 minutos a $37^\circ C$ en una solución salina fisiológica (pH 7,4) de la siguiente composición (en mM): NaCl 119; HEPES 20; KCl 4,6; $MgSO_4$ 1; Na_2HPO_4 0,15; KH_2PO_4 0,4; $NaHCO_3$ 1; $CaCl_2$ 1,2 y glucosa 5,5. La producción aórtica de O_2^- fue estimulada en algunos anillos mediante la adición de NADPH ($10^{-4} M$). Los anillos fueron posteriormente colocados para la medida

en tubos que contenían solución salina fisiológica, con o sin NADPH, tal y como se incubaron, y la lucigenina fue inyectada automáticamente hasta una concentración final de 5 μM . La actividad NADPH oxidasa se determinó midiendo la luminiscencia de la lucigenina mediante un luminómetro (Lumat LB 9507, Berthold, Alemania) durante 200 segundos en intervalos de 5 segundos. Luego los anillos fueron desecados y se determinó su peso seco. La actividad NADPH oxidasa se expresó como unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/mg de tejido seco.

3.8. Determinación de la actividad de la mieloperoxidasa.

La actividad de la mieloperoxidasa (MPO) fue medida en aortas congeladas, homogenizadas y centrifugadas. Los pellets fueron resuspendidos y sujetos a tres ciclos de congelación y descongelación, previos al paso de centrifugación final. El sobrenadante generado fue analizado por triplicado para determinar la actividad de MPO realizando mediciones de cinéticas durante 6 minutos a 460 nm (10 μl de muestra con 90 μl del buffer de reacción que contiene 50 mM buffer fosfato potásico, 0,167 mg ml^{-1} de dihidrocloruro de odianisidina y 0,0006% H_2O_2). Los resultados fueron expresados como unidades de MPO por gramo de tejido.

3.9. Ensayos inmunohistoquímicos.

Secciones de anillos de la aorta torácica fueron incubados con buffer citrato de sodio (10 mM citrato de sodio y 0,05% Tween 20, pH 6) a 95 °C por 20 minutos, para retraer los antígenos. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con 1% de H_2O_2 en PBS durante 20 minutos. La detección de CD68 fue llevada a cabo usando un anti-CD68 (EDI, dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa

Cruz, California, EE.UU.) e InmunoCruz™ mouse ABC Staining System (Santa Cruz Biotechnology). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina.

3.10. Expresión vascular de diferentes proteínas mediante Western Blot.

La expresión proteica fue medida en el sobrenadante de los homogenados de las aortas procedentes de los distintos grupos experimentales.

3.10.a. Para analizar la expresión proteica de eNOS, fosfo-eNOS, fosfo-caveolina-1, caveolina-1 mediante el análisis por western blot, los anillos aórticos de los diferentes grupos, conservados a - 80 °C, fueron homogeneizados en frío mediante un potter de cristal. La composición del tampón de homogeneización utilizado (pH 7,4) fue (en mM): HEPES 10; sacarosa 320; EDTA 0,1; ditiotreitól (DTT) 1; PMSF 0,5; ácido okadoico 0,01 y leupeptina 4 µg/mL.

3.10.b. Para la determinación de la subunidad p47^{phox}, p22^{phox}, NOX-1, NOX-2 y NOX-4 de la enzima NADPH oxidasa. La composición del tampón de homogeneización (pH 8) fue (en mM): HEPES 10; KCl 10; EDTA 1; EGTA 1; DTT 1; N- α -para-tosil-L-lisina clorometilamina 4; NaF 5; Na₂MoO₄ 10; Na₃VO₄ 1; PMSF 0,5 y ácido okadoico 0,01; aprotinina 40 µg/mL y leupeptina 4 µg/mL.

La expresión proteica fue medida en el sobrenadante de sus homogenados aórticos tras 30 minutos de centrifugación a 13000 r.p.m. a 4 °C.

Se siguieron los mismo pasos que en el apartado 2.4.

En la tabla 2 se hace referencia de los distintos anticuerpos utilizados en las determinaciones de las distintas proteínas.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en las determinaciones de expresión proteica.

Anticuerpo primario (Casa comercial)	Anticuerpo secundario (Casa comercial)	Concentración del gel de SDS- poliacrilamida	kDa
policlonal de conejo anti-p47^{phox} (Santa Cruz Biotechnology)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	12 %	47
policlonal de cabra anti-p22^{phox} (Santa Cruz Biotechnology)	conejo anti-caprino conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	15 %	22
monoclonal de ratón anti-caveolina-1 (Cell Signaling Technology)	caprino anti-ratón conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	15%	22
monoclonal de ratón anti-fosfo-caveolina-1 (Santa Cruz Biotechnology)	conejo anti-ratón conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	15%	22
policlonal de conejo anti-fosfo-eNOS (Ser¹¹⁷⁷) (Cell Signaling Technology)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	8 %	140
monoclonal de ratón anti-eNOS (Cell Signaling Technology)	caprino anti-ratón conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	8 %	140
monoclonal de conejo anti-fosfo-AKT (Ser⁴⁷³) (Cell Signaling Technology)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	9 %	60
monoclonal de conejo anti-AKT (Cell Signaling Technology)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	9 %	60
policlonal de conejo anti-NOX-1 (Santa Cruz Biotechnology)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	10 %	65
monoclonal de ratón anti-NOX-2 (Santa Cruz Biotechnology)	caprino anti-ratón conjugado con peroxidada peroxidada (Sigma-Aldrich)	10%	91
policlonal de conejo anti-NOX-4 (Novus Biologicals)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	10%	31,8-67
policlonal de conejo anti-ERK 1/2 (Cell Signaling Technology)	caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)	12 %	42-44

<p>policlonal de ratón anti-fosfo-ERK1/2 (Sigma-Aldrich)</p>	<p>caprino anti-ratón conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)</p>	<p>12 %</p>	<p>42-44</p>
<p>policlonal de conejo anti-fosfo-IRS-1 (Ser⁶³⁶) (Santa Cruz Biotechnology)</p>	<p>caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)</p>	<p>8 %</p>	<p>170-185</p>
<p>policlonal de conejo anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr¹⁸³/Tyr¹⁸⁵) (Cell Signaling)</p>	<p>caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)</p>	<p>10 %</p>	<p>46-54</p>
<p>policlonal de conejo anti-SAPK/JNK (Cell Signaling)</p>	<p>caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)</p>	<p>10 %</p>	<p>46-54</p>
<p>policlonal de conejo anti-AMPKα (Cell Signaling)</p>	<p>caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)</p>	<p>10 %</p>	<p>62</p>
<p>monoclonal de conejo anti-fosfo-AMPKα (Thr¹⁷²) (Cell Signaling)</p>	<p>caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich)</p>	<p>10 %</p>	<p>62</p>

3.11. Expresión de diferentes genes mediante PCR.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) cuantitativa en tiempo real se utilizó para analizar la expresión de mRNA de distintos genes.

Se siguieron los mismos pasos que en el apartado 2.5.

El gen de referencia elegido fue β -actina y su expresión fue empleada como control de carga en los distintos experimentos. Se emplearon las distintas secuencias o primers:

Tabla 3. Secuencia de primers.

Diana mRNA	Descripción	Sense	Antisense
<i>Actina</i>	Beta actina	AATCGTGCGTGACATC AAAG	ATGCCACAGGATTCCA TACC
p47 ^{phox}	p47 ^{phox}	AAAGAAACCGTGCTGA CTGG	AGTTACAGGCCGATG TGACC
p22 ^{phox}	p22 ^{phox}	GCGGTGTGGACAGAAG TACC	CTTGGGTTTAGGCTCA ATGG
<i>PK-4</i>	Piruvato deshidrogenasa kinasa, isoenzima 4	AGGTCGAGCTGTTCTC CCGCT	GCGGTCAGGCAGGAT GTCAAT
<i>CPT-1</i>	Carnitina palmitoiltransferasa 1	TTCACTGTGACCCCAGA CGGG	AATGGACCAGCCCCAT GGAGA
<i>PPAR-β</i>	Receptor beta activado por el proliferador de peroxisomas	CATTGAGCCCAAGTTC GAGT	GGTTGACCTGCAGAT GGAAT
<i>PPAR-α</i>	Receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas	TGTGACTGGTCAAGCT CAGG	CTTCCGGAACTCTCCT CTCC
<i>PPAR-γ</i>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	AAGAACCATCCGATTG AAGC	CCAACAGCTTCTCCTT CTCG
<i>NOX-1</i>	NADPH oxidasa-1	TCTTGCTGGTTGACACT TGC	TATGGGAGTGGGAAT CTTGG
<i>NOX-4</i>	NADPH oxidasa-4	ACAGTCCTGGCTTACCT TCG	TTCTGGGATCCTCAT CTGG
<i>caveolin-1</i>	caveolina-1	TCTACAAGCCCAACAAC AAGG	AGGAAAGAGAGGATG GCAAAG
<i>eNOS</i>	Oxido nitric sintasa endotelial	ATGGATGAGCCAACTC AAGG	TGTCGTGTAATCGGTC TTGC
<i>PreproET-1</i>	Preproendotelina-1	CTCGCTCTATGTAAGTC ATGG	GCTCCTGCTCCTCCTG ATG

La cuantificación se realizó utilizando el método $\Delta\Delta Ct$ (*Cycle threshold*, ciclo umbral).

3.12. Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media aritmética \pm S.E.M.

La evolución de la presión sistólica en la cola durante el tiempo de tratamiento se comparó usando un diseño anidado, con el tratamiento y días como factores fijos y la rata como el factor al azar. Cuando la diferencia total fue significativa, las comparaciones se realizaron usando el método de Bonferroni con un error apropiado. El análisis del diseño anidado también se llevó a cabo con grupos y concentraciones para comparar las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina. El resto de las variables se compararon usando un diseño de dos vías, donde el grupo y el tratamiento fueron factores efectivos fijos con desigual tamaño de muestra en los diferentes grupos. Cuando la interacción fue significativa se usó el método de Bonferroni para aparear comparaciones. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las curvas concentración-respuesta fueron ajustadas a la ecuación: $E = E_{\max} / (1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - \text{pD}_2)})$, donde E_{\max} es el efecto máximo, k es un factor que representa la pendiente de la curva y pD_2 es la concentración del fármaco que exhibe el 50 % del E_{\max} expresado como logaritmo molar negativo.

3.13. Reactivos.

GW0742 y GSK0660 fueron adquiridos de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido) y DAPI (Calbiochem, Darmstadt, Alemania).

Los anticuerpos de conejo anti-fosfo-eNOS-ser-1177, ratón anti-eNOS y ratón anti-caveolina-1 de Cell Signalling Technology, Massachusetts, EE.UU. Los anticuerpos de ratón anti-fosfo-caveolina-1, de cabra anti-p22^{phox}, de conejo anti-p47^{phox}, de conejo anti-NOX-1, de ratón anti-NOX-2, los anticuerpos de peroxidasa secundarios conjugados de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EE.UU.). El sistema de electroquimioluminiscencia fue de Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, Reino Unido). El resto de los productos fueron obtenidos de Sigma (Alcobendas, Madrid, España), o Panreac Química S.A. (Barcelona, España). Los anticuerpos de conejo anti-NOX-4 de Novus Biologicals (Littleton, Colorado).

Todos los reactivos y productos químicos se disolvieron en agua destilada, excepto GW0742 que se mezcló con metilcelulosa al 1 % para experimentos *in vivo*. Para experimentos *in vitro* GW0742 y L164051 se disolvieron en DMSO.

Resultados.

Resultados

1. Efectos de los agonistas PPAR β , GW0742 y L165041 sobre la señalización de insulina en HUVECs en condiciones de hiperglucemia.

1.1. Efecto de la alta glucosa sobre la producción de NO estimulado por insulina en HUVECs.

La exposición de las HUVECs a insulina (500 nM) incrementó significativamente la intensidad de fluorescencia de DAF-2 en comparación con las células no estimuladas (Figura 8A). La señal de fluorescencia fue suprimida por el inhibidor de la eNOS, L-NAME (10^{-4} M). El inhibidor de PI3K, LY-294002 (10 μ M) también inhibió el incremento de fluorescencia de DAF-2 inducido por insulina, involucrando a PI3K en la vía de señalización de insulina que conduce a la estimulación de la producción de NO.

Las HUVECs incubadas en medio alto en glucosa (30 mM, durante 24 horas) redujeron significativamente tanto la producción de NO basal como la dependiente de insulina en comparación con las células en condiciones de baja glucosa (Figura 8A).

Para investigar si este efecto inhibitorio de la hiperglucemia estaba restringido a la síntesis de NO estimulado por insulina, se examinó el efecto de alta glucosa sobre la producción de NO estimulada por el ionóforo de calcio, A23187 (Figura 8B). Como se muestra, el A23187 rápidamente estimuló la síntesis de NO en HUVECs incubadas en 5 ó 30 mM de glucosa. No hubo diferencias significativas en la producción de NO estimulada por A23187 entre ambas concentraciones de glucosa. La producción de NO dependiente de A23187 fue suprimida por el

inhibidor de la eNOS, L-NAME o el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM (10 μ M).

Además, la exposición de las HUVECs a alta glucosa redujo la fosforilación de Akt (Figura 8C) y de eNOS (Figura 8D) estimulada por insulina comparada con células en condiciones de baja glucosa.

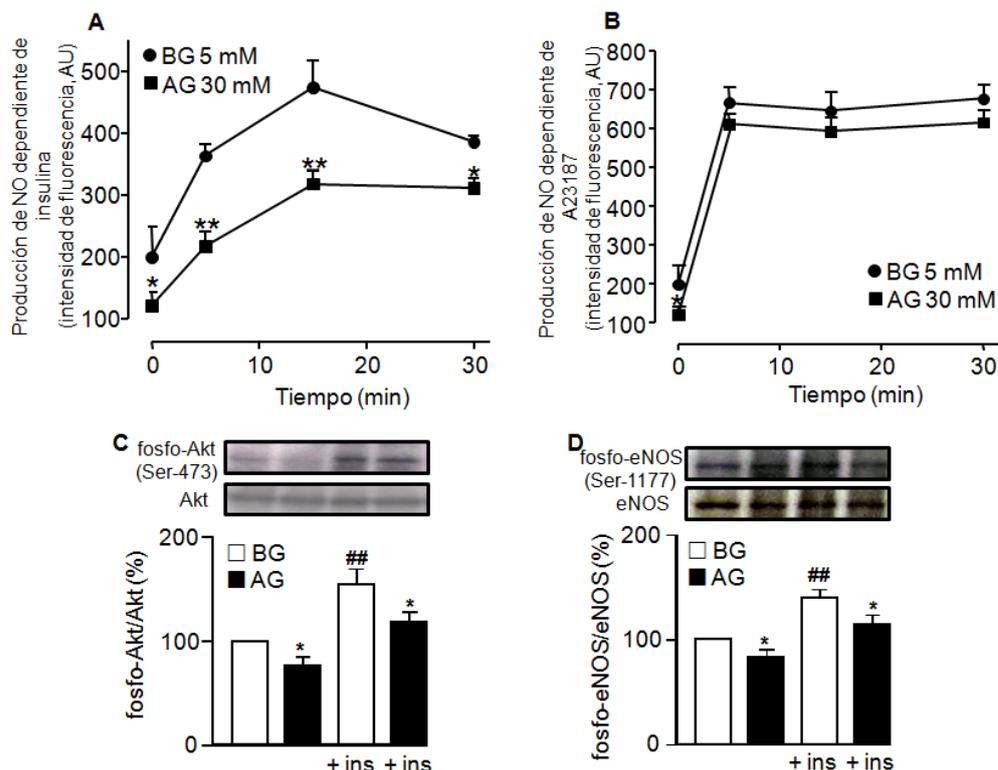


Figura 8. Disrupción en la señalización de insulina en cultivo primario de HUVECs en condiciones de alta glucosa. Detección por DAF-2 de la liberación de NO de HUVECs incubadas durante 24 horas en baja (BG, ●, 5 mM) o alta glucosa (AG, ■, 30 mM). Posteriormente, la insulina (500 nM) (A) o el ionóforo de calcio (A23187, 1 μ M) (B) fueron añadidos, y la fluorescencia fue medida a 0, 5, 15 y 30 min, respectivamente. La auto fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada a cada valor. Todos los datos representan la media \pm SEM (n = 8). *P < 0,05, **P < 0,01 vs células expuestas a baja glucosa. Expresión de fosfo-Akt (C) y fosfo-eNOS (D) por western blots en HUVECs en 5 o 30 mM de glucosa, en condiciones basales y en condiciones estimuladas con insulina (500 nM durante 10 min). Los resultados son la media \pm SEM (n = 4-6) de los valores densitométricos normalizados con la AKT o la eNOS correspondiente. ##P < 0,01 vs valores basales.

1.2. La activación de PPAR β mejora el daño en la vía Akt - eNOS en condiciones de alta glucosa en respuesta a la insulina.

Cuando las HUVECs fueron incubadas en medio bajo en glucosa durante 24 horas, la coincubación con los agonistas PPAR β , L165041 ó GW0742 (1 ó 10 μ M), no modificó la producción de NO, (Figura 9A, 9B), ni la fosforilación de Akt (Figura 9C) y de eNOS estimulada por insulina (Figura 9D).

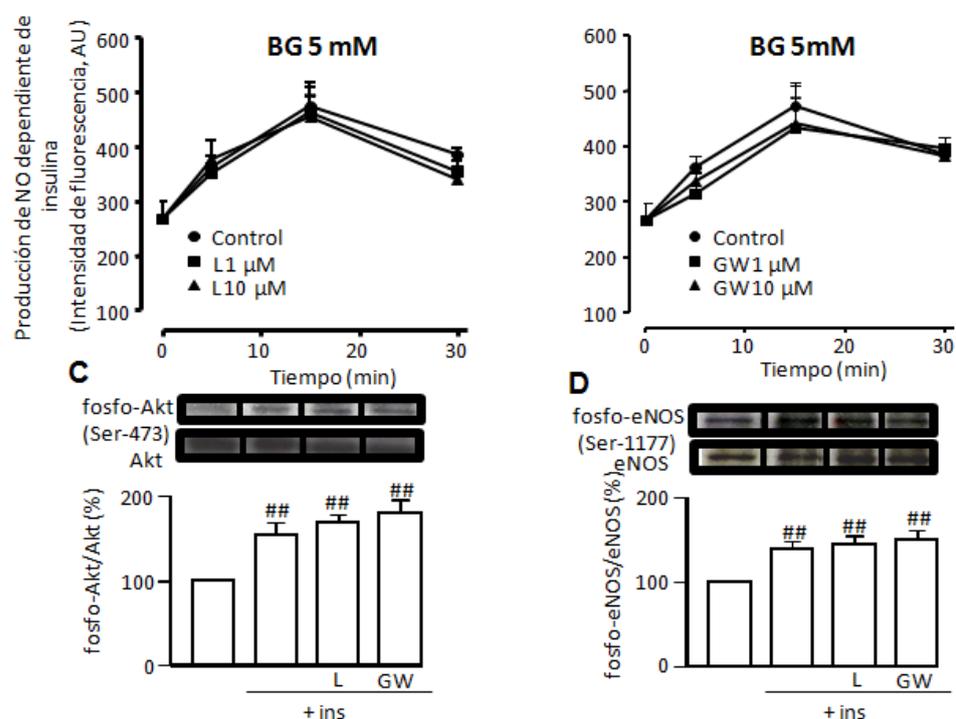


Figura 9. La producción de NO mediada por insulina en HUVECs expuestas a condiciones de baja glucosa por 24 horas, co-incubadas con los agonistas PPAR β , L165041 (L, 1 y 10 μ M) (A) o GW0742 (G, 1 y 10 μ M) (B). La fosforilación de Akt (C) y eNOS (D) en HUVECs expuestas a condiciones de baja glucosa durante 24 horas co-incubadas con los agonistas PPAR β (10 μ M). Todos los datos son la media \pm SEM ($n = 8$) de los valores densitométricos normalizados con la AKT o eNOS correspondiente. Los paneles muestran bandas representativas ($n = 4-6$). ^{##} $P < 0,01$ vs valores basales.

Sin embargo, se observó que la incubación con ambos agonistas PPAR β , de manera concentración dependiente, incrementó la producción de NO en HUVECs expuestas a alta glucosa (Figura 10A, 10B). Por otra parte, en condiciones de alta glucosa ambos agonistas, a 10 μ M, también incrementaron la fosforilación de Akt (Figura 10C) y de eNOS (Figura 10D).

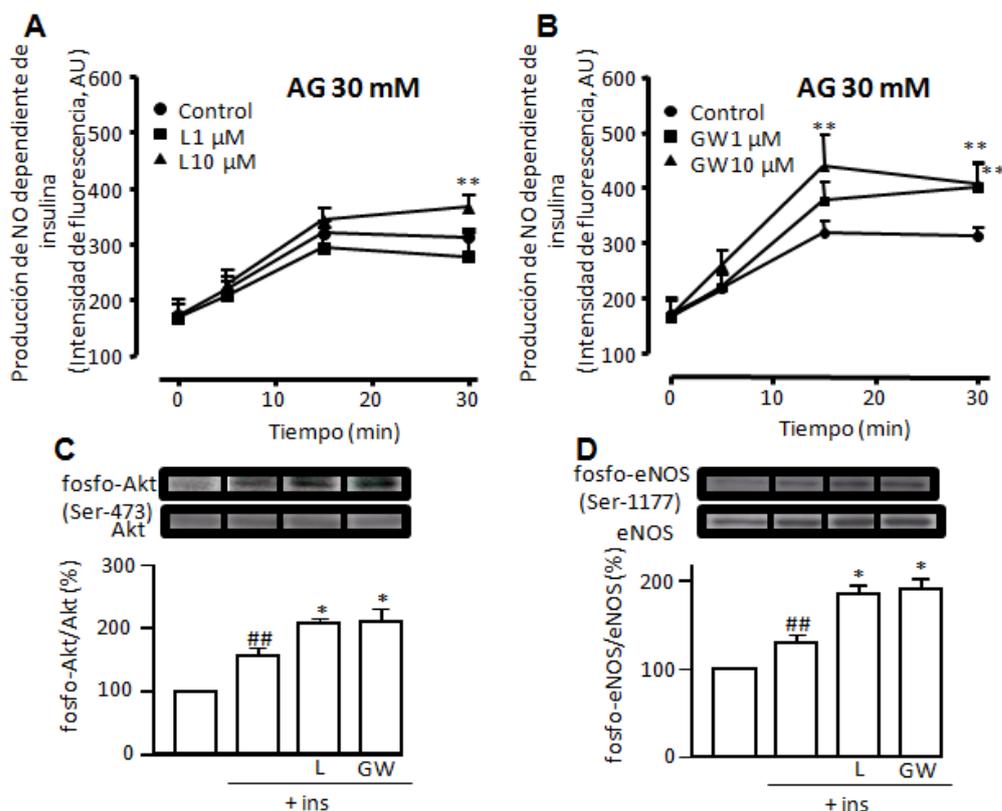


Figura 10. La producción de NO mediada por insulina en HUVECs expuestas a condiciones de alta glucosa por 24 horas co-incubados con los agonistas PPAR β , L165041 (L, 1 y 10 μ M) (A) o GW0742 (G, 1 y 10 μ M) (B). ** $P < 0,01$ vs control. La fosforilación de Akt (C) y eNOS (D) en HUVECs expuestas a condiciones de alta glucosa durante 24 horas co-incubadas con los agonistas PPAR β (10 μ M). Todos los datos son la media \pm SEM ($n = 8$) de los valores densitométricos normalizados con la AKT o eNOS correspondiente. Los paneles muestran bandas representativas ($n = 4-6$). * $P < 0,05$ vs condiciones de control. ## $P < 0,01$ vs valores basales.

Los efectos beneficiosos tanto a nivel de expresión como funcional inducido por ambos agonistas se suprimieron cuando las HUVECs fueron también incubadas con el antagonista específico de PPAR β , GSK0660 (1 μ M) (Figura 11).

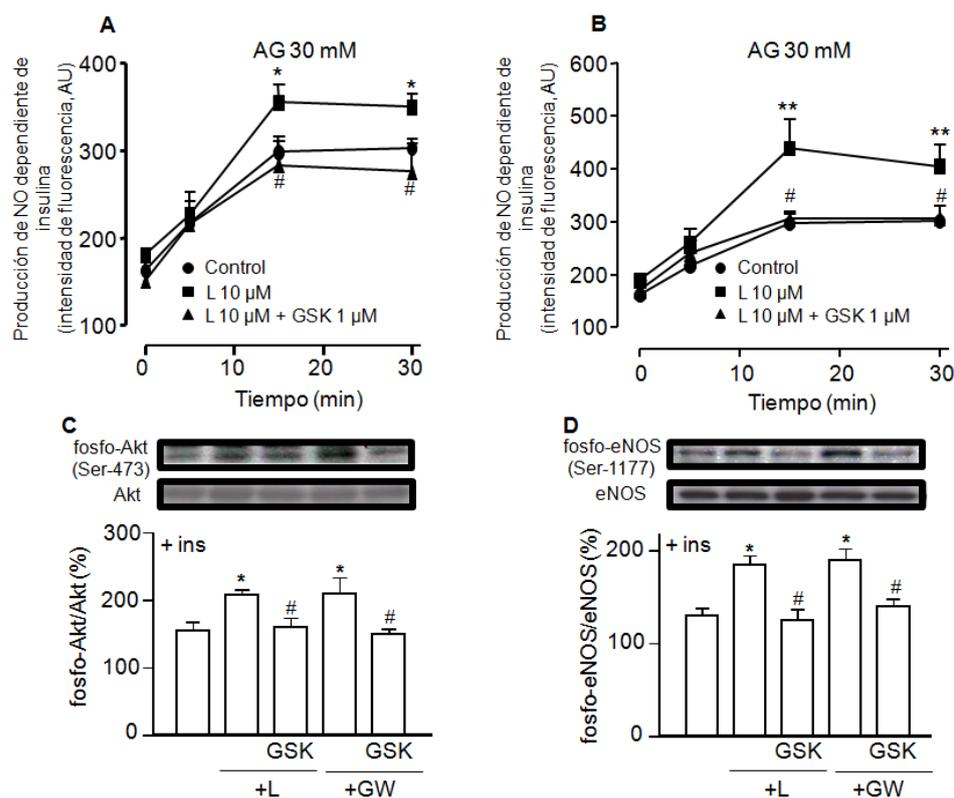


Figura 11. Efectos de los agonistas PPAR β sobre el daño en la señalización de la insulina en cultivos primarios de HUVECs en condiciones de alta glucosa. La producción de NO mediada por insulina (A,B) y la fosforilación de Akt (C) y eNOS (D) en HUVECs incubadas con alta glucosa durante 24 horas, co-incubadas con los agonistas PPAR β , L165041 (A) o GW0742 (B) (10 μ M), solo o pre-incubadas con el antagonista PPAR β , GSK0660 (1 μ M). La auto fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada a cada valor. Todos los datos son la media \pm SEM (n = 8). Los datos presentados como valores densitométricos fueron normalizados con su AKT o eNOS correspondiente. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM (n = 4-6 experimentos). *P < 0,05 y **P < 0,01 vs control. #P < 0,01 vs L o GW sin GSK.

Para confirmar estas observaciones, en otra serie de experimentos, las HUVECs fueron tratadas con un siRNA específico de PPAR β . Transcurridas 48 horas después de la transfección, las HUVECs presentaban una disminución mayor al 80% en el mRNA del PPAR β (Figura 12A) y más del 85% en su expresión proteica (Figura 12B) en comparación con las células tratadas con el siRNA control. En las células silenciadas para PPAR β , pero no el siRNA control, se inhibió el incremento en la producción de NO estimulada por insulina inducida por ambos ligandos PPAR β en condiciones de hiperglucemia (Figura 12C).

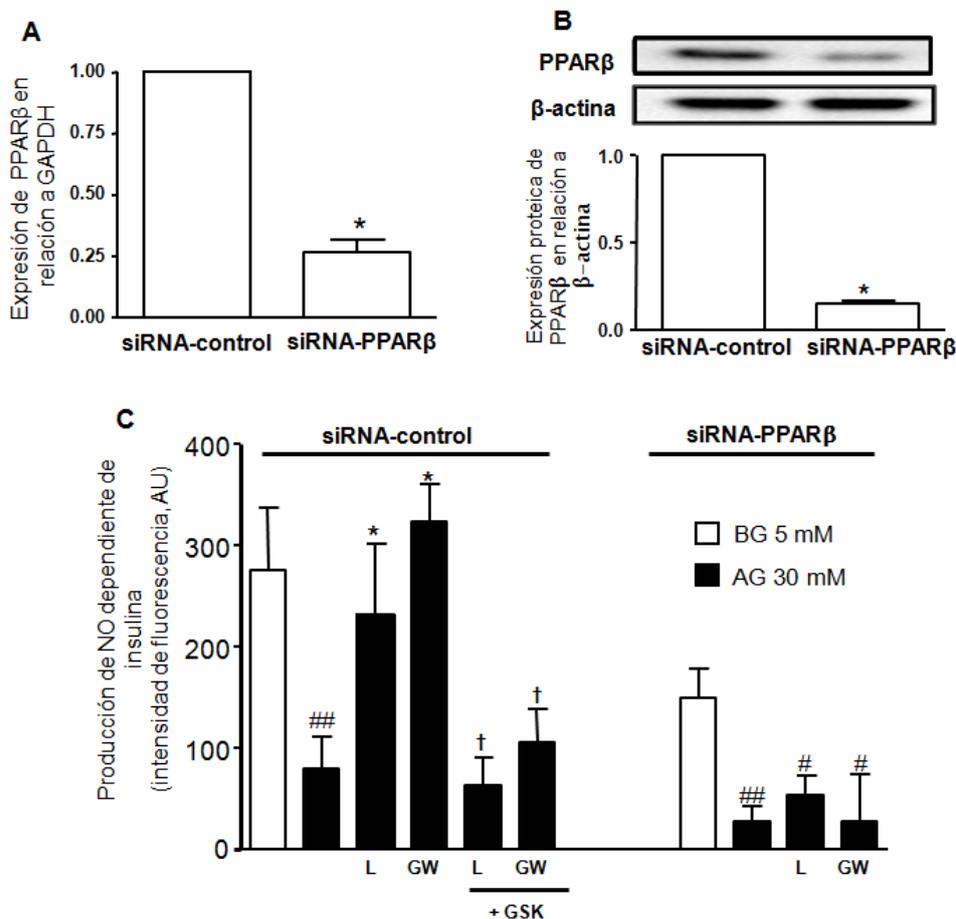


Figura 12. El siRNA específico de PPAR β previno el incremento de la producción de NO mediado por insulina de ambos agonistas PPAR β en HUVECs incubadas en alta glucosa. Expresión de PPAR β de mRNA por RT-PCR a tiempo real (A) y de proteínas por western blot (B) en HUVECs transfectadas con el siRNA específico de PPAR β o el vector vacío (siRNA-control). Los datos se presentan como expresión génica normalizada a niveles de GAPDH o valores densitométricos de proteínas normalizadas con su correspondiente β -actina. Los resultados son representativos de $n=4$ de experimentos independientes. * $P < 0,05$ vs siRNA-control. La producción de NO mediada por insulina (C) en siRNA control y en células siRNA-PPAR β incubadas en medio bajo (BG, \square) o alto en glucosa (AG, \blacksquare) durante 24 horas, en presencia o ausencia de GW0742 o L165041 (10 μ M) solo o preincubado con GSK0660 (1 μ M). La auto fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada a cada valor. Todos los datos son la media \pm SEM ($n = 8$). # $P < 0,01$ y ### $P < 0,01$ vs medio bajo en glucosa. * $P < 0,05$ vs condiciones control. † $P < 0,05$, vs columna L o GW sin GSK.

Para determinar si este efecto protector en alta glucosa es selectivo de PPAR β , se examinaron los efectos de un agonista selectivo de PPAR α , clofibrato, o de PPAR γ , ciglitazona. Ambos agentes también fueron capaces de prevenir en condiciones de hiperglucemia la disminución de la síntesis de NO estimulada por insulina (Figura 13).

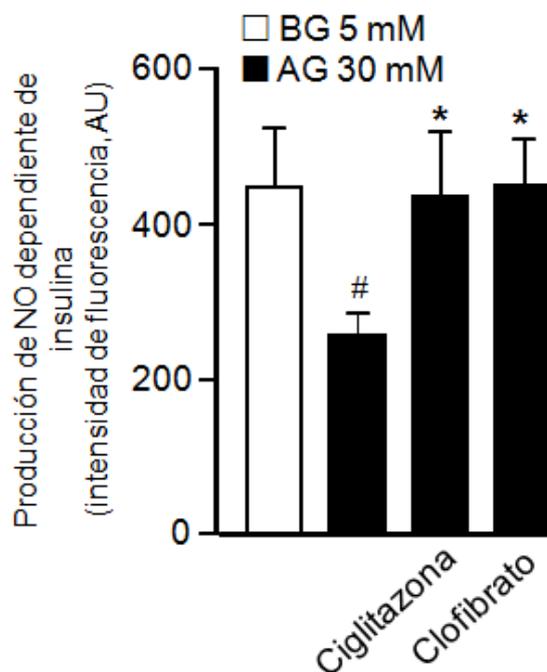


Figura 13. Efectos de los agonistas selectivos de PPAR α , clofibrato, y PPAR γ , ciglitazona, sobre la producción de NO mediada por insulina en condiciones de hiperglucemia. Las HUVECs fueron incubadas con el agonista PPAR α , clofibrato (1 μ M), y el agonista PPAR γ , ciglitazona (1 μ M), durante 24 horas en medio bajo (5 mM, BG, \square) o alto en glucosa (30 mM, AG, \blacksquare). La producción de NO fue medida por DAF-2 fluorescente a los 15 minutos de adicionar insulina (500 nM). La auto fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada a cada valor. Todos los datos representan la media \pm SEM ($n = 8$). # $P < 0,05$ vs medio bajo en glucosa. * $P < 0,05$ vs condiciones controles.

1.3. Papel de la AMPK y la MAPK en el efecto protector de los agonistas PPAR β .

La Proteína Kinasa activada por AMP (AMPK) coimmunoprecipita con la eNOS incrementando su fosforilación en la ser 1177 y la producción de NO (Chen *et al.*, 1999; Morrow *et al.*, 2003). En células hepáticas tanto los elevados niveles de glucosa como el aumento en los ácidos grasos libres disminuyen la actividad de la AMPK (Suchankova *et al.*, 2009; Barroso *et al.*, 2011). La activación crónica de PPAR β restauró la actividad de la AMPK en el hígado de ratones que consumieron una dieta rica en grasa (Barroso *et al.*, 2011). Además, la activación de PPAR α con fenofibrato estimuló la fosforilación de eNOS y la producción de NO en HUVECs por activación de AMPK (Murakami *et al.*, 2006, Okayasu *et al.*, 2008). Para determinar si AMPK está involucrada en el efecto protector de los agonistas PPAR β , se examinó el efecto del inhibidor de AMPK, compuesto C, sobre la producción de NO estimulada por insulina (Figura 14A) así como el efecto de los agonistas PPAR β sobre la fosforilación de Thr-172 AMPK (Figura 14B). Se observó que la inhibición de AMPK con incubación previa (1 hora antes de la determinación de NO) con el compuesto C, no modificó el incremento en la producción de NO estimulada por insulina inducido por ambos agonistas, GW0742 y L165041 (10 μ M) en HUVECs en condiciones de alta glucosa (Figura 14A). Por otro lado, la fosforilación de AMPK no fue alterada por la hiperglucemia y ninguno de los agonistas indujeron cambios en dicha fosforilación (Figura 14B).

Las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs), tales como la kinasa regulada por señal extracelular (ERK)1/2 y las kinasas terminales c-Jun NH2 (JNK), son proteínas serina/treoninas kinasas activadas por estrés las cuales interfieren con la señal de insulina incrementando la fosforilación de

componentes claves en su ruta de señalización, tal como el IRS-1, modificando la capacidad de dicha proteína para unirse y activar otras nuevas proteínas específicas que tienen en común un dominio -SH2- (Rains y Jain, 2011). Niveles elevados de glucosa disminuyeron la proliferación de las HUVECs a través de un aumento en la fosforilación de (ERK)1/2 (Chen *et al.*, 2007). Efectos protectores de los agonistas PPAR β en la producción de citoquinas inducidas por lipopolisacárido en adipocitos (Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008) y la proliferación del músculo liso vascular en ratas inducido por PDGF (Lim *et al.*, 2009) parecen estar relacionados con la prevención de la fosforilación de ERK1/2. Para investigar si las MAPKs están involucradas en el efecto protector de PPAR β en la vía de señalización de la insulina, se analizó los efectos del inhibidor de ERK1/2, PD98059 (10 μ M), y del inhibidor de JNK, SP600125 (25 μ M) en la producción de NO estimulada por insulina en HUVECs incubadas en medio alto en glucosa (Figura 14C). La inhibición de ERK1/2 suprimió el efecto reductor de la síntesis de NO estimulada por insulina en un medio con alto contenido en glucosa sin observarse cambios en presencia del inhibidor de JNK. Además, la fosforilación de ERK1/2 inducida por alta glucosa tras una incubación de 12 horas fue suprimida por la coincubación tanto con GW0742 como con L165041 (10 μ M) (Figure 14D).

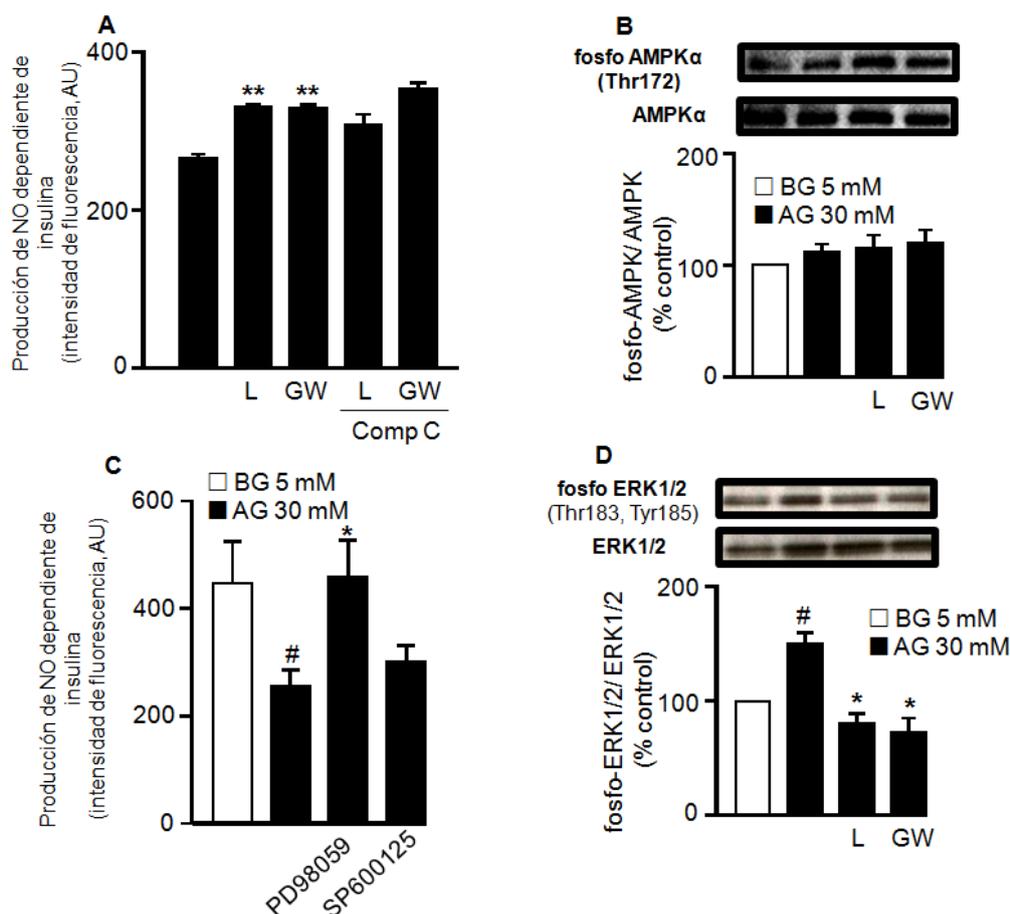


Figura 14. Papel de la AMPK (A, B) y de la MAPK (C, D) en el efecto protector de PPAR β . Producción de NO mediada por insulina (A, C) y la fosforilación de AMPK α (B) y fosfo-ERK 1/2 (D) en HUVECs incubadas en un medio alto en glucosa durante 24 horas, y co-incubadas con los agonistas PPAR β , L165041 o GW0742 (10 μ M), solo o pre-incubado con el inhibidor de AMPK, el compuesto C (10 μ M), o el inhibidor de ERK1/2, el PD98059 (10 μ M), o el inhibidor de JNK, el SP600125 (25 μ M), durante 24 horas en medio bajo (5 mM, BG, \square) o alto en glucosa (30 mM, AG, \blacksquare). La producción de NO fue medida por DAF-2 fluorescente tras la estimulación con insulina (500 nM) a los 15 minutos. La auto fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada a cada valor. Todos los datos son la media \pm SEM (n = 8). Los histogramas representan valores densitométricos normalizados con su AMPK α o ERK1/2 correspondiente. Los paneles muestran bandas representativas (n = 3-5). #P < 0,05 vs medio bajo en glucosa. *P < 0,05 y **P < 0,05 vs condiciones control.

1.4. Papel de los genes diana de PPAR β , CPT-1 y PDK-4 en el efecto protector de sus agonistas.

Los agonistas PPAR β incrementaron la expresión de los genes diana de PPAR β (Takata *et al.*, 2003) involucrados en la oxidación de ácidos grasos, CPT-1, enzima que facilita el transporte de ácidos grasos a la matriz mitocondrial para su oxidación, y PDK-4, enzima clave que regula negativamente la glucólisis favoreciendo el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos. La activación de PPAR β previene la resistencia a la insulina inducida por ácidos grasos en células del músculo esquelético por incremento en la oxidación de ácidos grasos (Coll *et al.*, 2010). Se estudió el papel de CPT-1 y PDK-4 sobre el efecto beneficioso de los agonistas PPAR β en el daño inducido en la señalización de la insulina por elevados niveles de glucosa en HUVECs mediante la medida de la producción de NO estimulada por insulina en presencia de etomoxir, un inhibidor irreversible de CPT-1, o de DCA, un inhibidor de PDK-4. En estas condiciones experimentales, el DCA inhibió el incremento en la producción de NO inducida por GW0742 y L165041 (Figura 15A), sin presentar efecto el etomoxir (Figura 15B). Los niveles de mRNA de PDK-4 fueron incrementados de manera concentración dependiente por GW0742 (Figura 15C) y por L165041 (Figura 15D), en HUVECs incubadas en condiciones de baja y alta glucosa. Este efecto fue prevenido por la coincubación con el antagonista de PPAR β , GSK0660, involucrando la activación de dicho receptor.

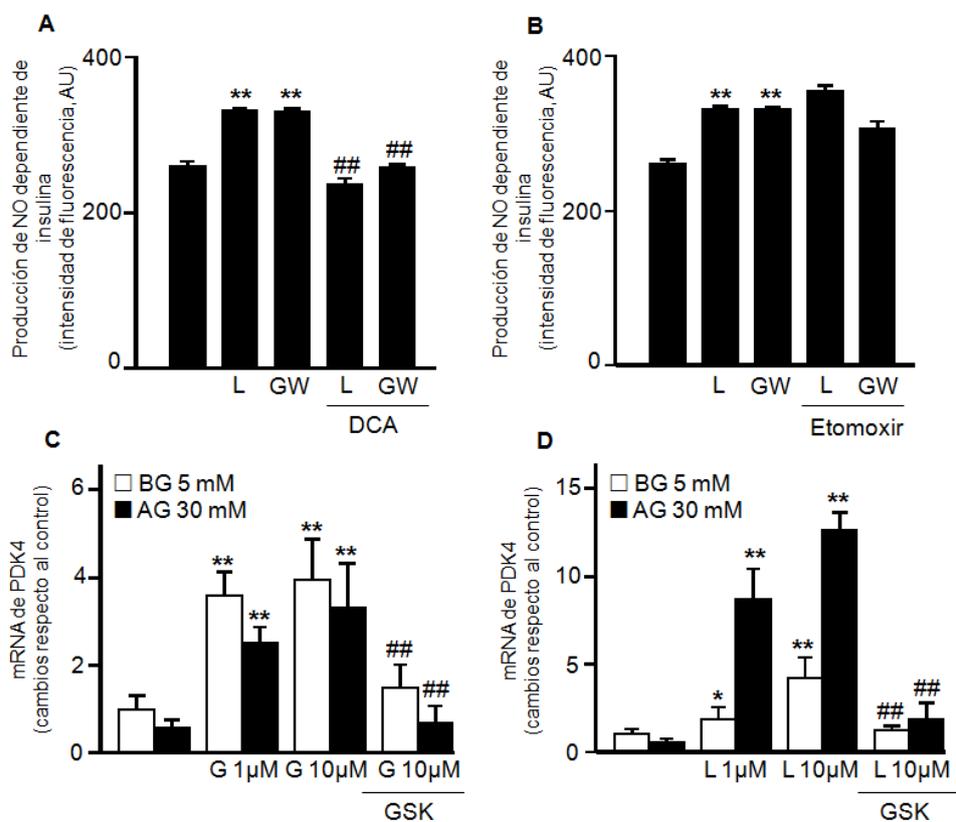


Figura 15. Papel de los genes diana de PPAR β , CPT-1 y PDK-4 en el efecto protector de los agonistas PPAR β . La producción de NO mediada por insulina (A, B) y la expresión de mRNA de PDK-4 por la RT-PCR en tiempo real (C, D) en HUVECs incubadas en condiciones de baja (5 mM, BG, □) o alta glucosa (30 mM, AG, ■) durante 24 horas, coincubación con agonistas PPAR β , L165041 ó GW0742 (10 μ M) solo o pre-incubadas con un inhibidor irreversible de CPT-1, etomoxir (40 μ M) o un inhibidor de PDK-4, el DCA (10 μ M) 30 minutos antes de medir la producción de NO. La auto fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 fue restada a cada valor. Todos los datos son la media \pm SEM (n = 8). Los datos se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). *P < 0,05 y **P < 0,01 vs control. ###P < 0,01 vs columna de L y G.

1.5. Efectos de los agonistas PPAR β en la producción intracelular de ROS.

La hiperglucemia incrementa la producción de ROS mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 2000), modificando la vía de la insulina IRS-1/Akt/eNOS. Esta alteración en la vía de la insulina se debe a la fosforilación del residuo de serina-636 de IRS-1 provocando una disminución de su unión a la subunidad reguladora p85 de PI3K y promoviendo la resistencia a insulina (Esposito *et al.*, 2001). Para estudiar si el efecto protector del agonista PPAR β , L165041 podría estar relacionado con la inhibición de la generación de ROS se midió ROS intracelular en HUVECs. Se observó que, comparado con las condiciones basales (5 mM glucosa), la incubación con 30 mM de glucosa incrementó la producción de ROS (Figura 16A). La rotenona no redujo este incremento, mientras que tanto TTFa como CCCP fueron capaces de prevenir completamente el efecto de la hiperglucemia. La incubación con L165041 (1 μ M) también suprimió la producción de ROS. La coincubación de este agonista PPAR β con GSK0660 ó DCA suprimió la inhibición de ROS inducida por L165041 en un medio alto en glucosa, involucrando en este efecto protector tanto a la activación de PPAR β como de PDK4, respectivamente. Además, el silenciamiento específico de PPAR β previno el efecto inhibitorio de L165041 sobre la sobreproducción de ROS mitocondrial inducida por hiperglucemia (Figura 16B).

Para estudiar si la producción de ROS en la mitocondria está involucrada en la activación de ERK1/2, se analizó la fosforilación de ERK1/2 en HUVECs incubadas en presencia de TTFa y catalasa. Ambos agentes suprimieron el incremento de la fosforilación de ERK1/2 inducido por alta glucosa (Figura 16C).

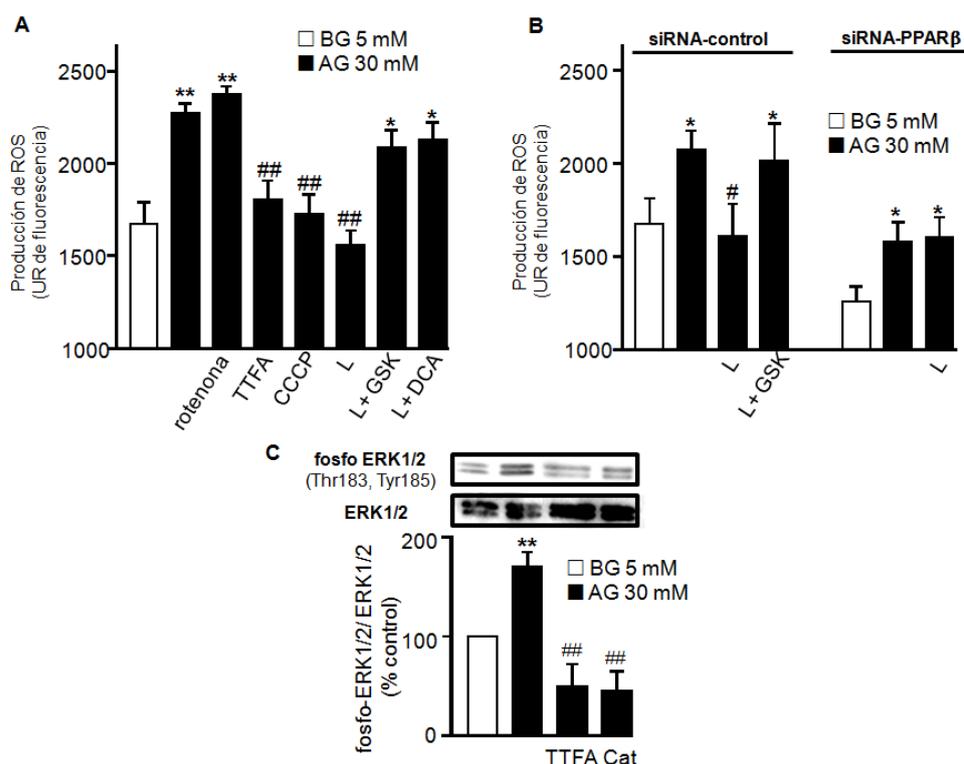


Figura 16. Efecto del agonista PPAR β en la producción intracelular de ROS. ROS intracelular fue medido por CM-H2DCFDA en HUVECs (A) y HUVECs transfectadas con siRNA específico de PPAR β (siRNA-PPAR β) (B) incubadas en medio en condiciones de baja (5 mM, BG, \square) o alta glucosa (30 mM, AG, \blacksquare) durante 24 horas en presencia o ausencia de L165041 (1 μ M), o el inhibidor del complejo I, rotenona (5 μ M), o el inhibidor del complejo II, tenoil-trifluoroacetona (TTFE 10 μ M), o el desacoplador de la fosforilación oxidativa, carbonil cianida *m*-clorofenohidrazona (CCCP, 0,5 μ M). Los inhibidores (GSK0660 1 μ M, o DCA 10 μ M) fueron añadidos 30 minutos antes de la incubación con L165041. (C) Fosforilación de ERK1/2 en HUVECs incubadas en presencia de TTFE y catalasa (300 UI/mL). Todos los datos son la media \pm SEM ($n = 8$), y los experimentos fueron repetidos independientemente al menos tres veces. Los datos representan los valores densitométricos normalizados con su correspondiente ERK1/2. Los paneles muestran bandas representativas ($n = 3-5$). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs medio bajo en glucosa, respectivamente. # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ vs medio alto en glucosa.

1.6. Efectos de los PPAR β en la fosforilación de IRS-1.

La hiperglucemia incrementó la fosforilación de Ser-636-IRS-1 en HUVECs. Este efecto fue prevenido en presencia de los agonistas PPAR β , GW0742 ó L165041 (Figura 17). La coincubación con el antagonista de PPAR β , GSK0660 restauró el nivel de fosforilación inducida por hiperglucemia. Curiosamente, la presencia del inhibidor de ERK1/2, PD98059, también suprimió el incremento en la fosforilación del IRS-1 inducida por altos niveles de glucosa.

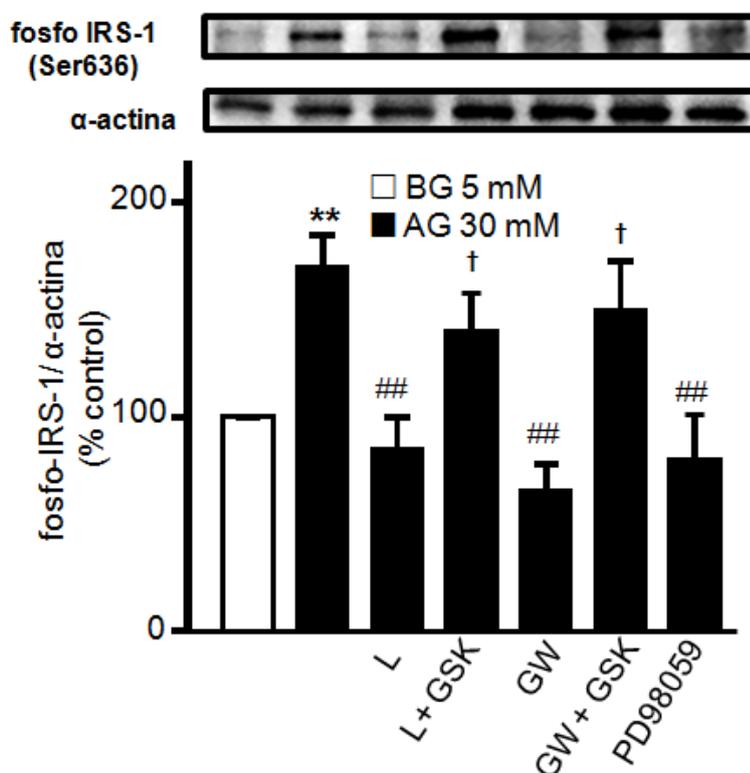


Figura 17. Efectos de los agonistas PPAR β en la fosforilación de IRS-1. Fosforilación de la ser-636-IRS-1 por western blot en HUVECs incubadas en medio bajo (5 mM, BG, □) o alto en glucosa (30 mM, AG, ■) durante 24 horas co-incubadas con los agonistas PPAR β , L165041 ó GW0742 (10 μ M), solo o pre-incubadas con el antagonista GSK0660 (1 μ M), o el inhibidor de ERK1/2, PD98059 (10 μ M). Se muestran bandas e histogramas que representan valores densitométricos normalizados con la correspondiente α -actina para western blot. Los paneles muestran bandas representativas ($n = 3-5$). ** $P < 0,01$ vs medio bajo en glucosa. ## $P < 0,01$ vs medio alto en glucosa. † $P < 0,05$ vs columna L y G, respectivamente.

2. Efectos del agonista PPAR β , GW0742, sobre la disfunción endotelial en ratas diabéticas tipo 1.

2.1. Efectos de GW0742 sobre la presión arterial, variables morfológicas y determinaciones plasmáticas.

Los niveles plasmáticos de glucosa y triglicéridos se encontraban elevados en ratas diabéticas, mientras que los niveles plasmáticos de colesterol HDL, PAS y FC fueron similares en ratas diabéticas en comparación con las ratas control. La administración crónica de GW0742 no alteró los niveles de glucosa, HDL, presión sistólica y frecuencia cardíaca, pero si redujo los niveles plasmáticos de triglicéridos en ratas diabéticas (Tabla 4).

Tabla 4. Presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca y determinaciones plasmáticas en todos los grupos experimentales.

Grupos	Control (n = 10)	Control-GW (n = 8)	Diabéticas (n = 8)	Diabéticas- GW (n = 8)
PAS inicial (mmHg)	157 ± 3	155 ± 4	164 ± 5	156 ± 3
PAS final (mmHg)	158 ± 4	157 ± 5	153 ± 5	156 ± 4
FC inicial (lpm)	429 ± 12	415 ± 16	445 ± 20	412 ± 11
FC final (lpm)	397 ± 16	410 ± 20	426 ± 34	426 ± 43
Colesterol (mg/dL)	54,3 ± 3,4	58,2 ± 4,6	68,7 ± 4,2	75,2 ± 10
Triglicérido (mg/dL)	67,3 ± 5,7	43,4 ± 5,7	103,9 ± 14,7*	68,1 ± 11,8‡
HDL (mg/dL)	41,7 ± 2,8	43,9 ± 3,6	38,4 ± 2,5	48,2 ± 3,9
Glucosa (mg/dL)	115,8 ± 7,4	130,7 ± 6,0	206,3 ± 28,4†	225,3 ± 23,6

Los valores se expresaron como la media ± SEM, de 10 ratas. *P < 0,05 y †P < 0,01 diabéticas vs. control; ‡P < 0,05 diabéticas tratadas- GW0742 vs. ratas diabéticas no tratadas.

El peso corporal (PC) fue menor en ratas diabéticas que en el grupo de no diabéticas. El peso del corazón (PCo), del ventrículo derecho (PVD), y del riñón (PR) en relación al PC fueron mayores en ratas diabéticas comparadas con los animales control.

El índice de Fulton medido como el peso del ventrículo derecho en relación al peso del ventrículo izquierdo más el septum PVD/ (PVI+S) o índice de hipertrofia ventricular derecha, y se encontraba significativamente incrementado en ratas diabéticas. El tratamiento crónico con GW0742 redujo la hipertrofia del corazón derecho sin afectar el peso corporal (PC), la relación PCo/PC y la relación PR/PC (Tabla 5).

Tabla 5. Peso corporal y de los órganos e índices cardíaco y renal.

	Control	Control-GW	Diabéticas	Diabéticas-GW
PC final (g)	333 ± 6	317 ± 4	247 ± 27†	254 ± 18
PCo (mg)	721 ± 17	715 ± 12	603 ± 55*	635 ± 33
PVD (mg)	164 ± 4	158 ± 5	158 ± 19	138 ± 7
PR (mg)	750 ± 15	745 ± 12	822 ± 41*	883 ± 28
PCo/PC	2,17 ± 0,03	2,25 ± 0,05	2,47 ± 0,11*	2,54 ± 0,13
PVD/PC	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,66 ± 0,09*	0,56 ± 0,04
PVD/(PVI+S)	0,296 ± 0,006	0,291 ± 0,007	0,363 ± 0,045*	0,279 ± 0,009‡
PR/PC	2,26 ± 0,03	2,35 ± 0,06	3,44 ± 0,24†	3,59 ± 0,31

PC, peso corporal; PCo, peso del corazón; PVD, peso del ventrículo derecho; PR, peso del riñón; PVD/ (PVI+S), índice de Fulton. Los valores se expresaron como la media ± SEM, (n= 8-10 ratas). *P<0,05 y †P<0,01 diabéticas vs. control; ‡P<0,05 diabéticas tratadas- GW0742 vs. ratas diabéticas no tratadas.

2.2. Efectos de GW0742 sobre PPAR y genes diana de PPARβ en la aorta.

La expresión génica de PPARα (Figura 18A), PPARγ (Figura 18B) y PPARβ (Figura 18C) estaba reducida, no modificada e incrementada, respectivamente, en aorta de ratas diabéticas en comparación con las ratas control. El tratamiento

crónico con GW0742 incrementó el mRNA de PPAR β en ratas diabéticas sin afectar la expresión de PPAR α y PPAR γ en anillos aórticos de ratas diabéticas control. Los niveles de mRNA de dos genes diana de PPAR β , PDK4 (Figura 18D) y CPT-1 (Figura 18E), estaban más elevados que en ratas no diabéticas. Como se esperaba, el agonista PPAR β incrementó significativamente la expresión de ambos genes en ratas diabéticas.

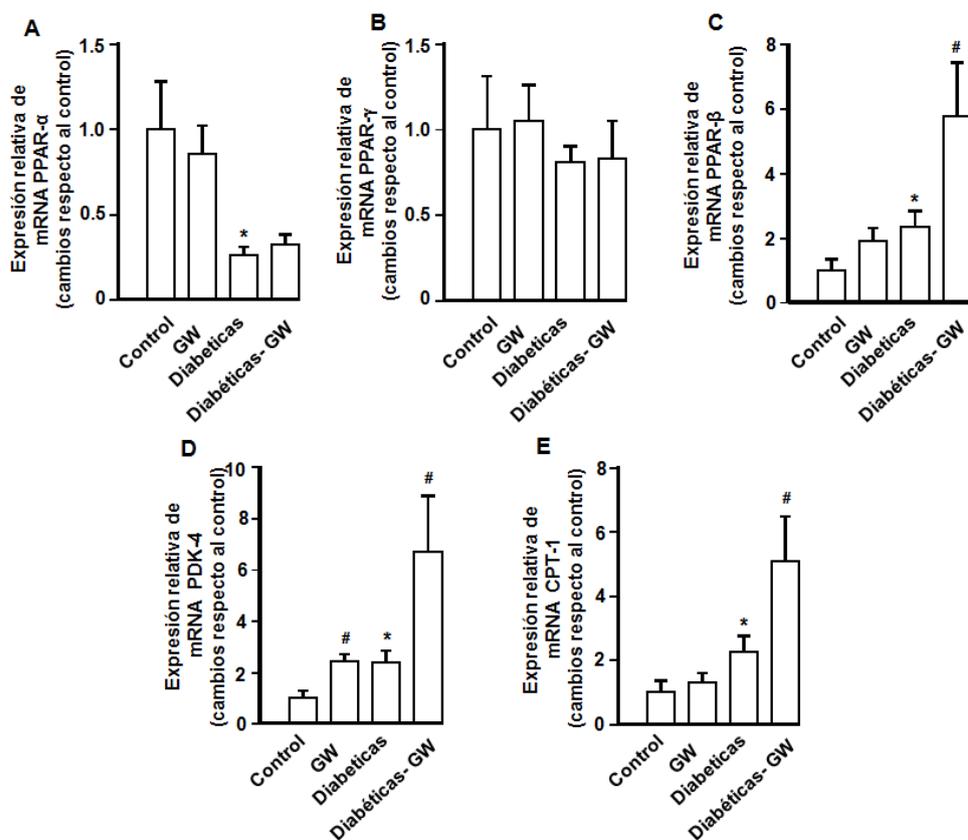


Figura 18. Efectos de GW0742 sobre PPAR y genes diana PPAR β en aorta. Los niveles de mRNA de PPAR α (A), PPAR γ (B), PPAR β (C), piruvato deshidrogenasa (PDK4) (D) y carnitina palmitoiltransferasa (CPT1) (E) de aorta de ratas diabéticas y no diabéticas. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ experimentos por separados). * $P < 0,05$ diabéticas vs. control, # $P < 0,05$ GW0742-tratadas vs. su respectivo control no tratado.

2.3. GW0742 mejora la disfunción endotelial en ratas diabéticas.

Las aortas de ratas diabéticas mostraron una reducción significativa de la vasodilatación dependiente de endotelio en respuesta a acetilcolina (ACh) (considerado como un índice de función endotelial) en comparación con aortas del grupo control (Figura 19A). El análisis de la curva concentración-respuesta indicó que las ratas diabéticas inducen un cambio en la respuesta relajante máxima (los valores de E_{\max} fueron $69 \pm 4 \%$ y $87 \pm 4 \%$ en los grupos diabéticos y control, respectivamente, $P < 0,01$) sin cambios significativos en la concentración inhibitoria 50 (los valores de $-\log IC_{50}$ fueron $6,96 \pm 0,18$ y $7,29 \pm 0,08$ en los grupos diabéticos y control, respectivamente, $P > 0,05$). El GW0742 produjo un incremento significativo en la relajación máxima inducida por ACh en ratas diabéticas ($E_{\max} = 86 \pm 3 \%$, $P < 0,01$ vs grupo diabéticas) sin efecto en las ratas controles no diabéticas ($E_{\max} = 85 \pm 3\%$). La curva concentración-respuesta al agonista α -adrenérgico, fenilefrina, produjo una respuesta máxima incrementada en el grupo diabético en comparación con el grupo control (Figura 19B, $E_{\max} = 1,30 \pm 0,14$ vs $0,84 \pm 0,10$ g/g de tejido, respectivamente, $P < 0,05$), sin cambiar la concentración eficaz 50 (los valores de $-\log EC_{50}$ fueron $6,88 \pm 0,06$ y $6,81 \pm 0,06$ en los grupos diabéticos y control, respectivamente, $P > 0,05$). El tratamiento con GW0742 previno el incremento en la respuesta vasoconstrictora máxima a fenilefrina en ratas diabéticas ($E_{\max} = 0,92 \pm 0,13$ g/g de tejido) sin afectar las ratas control ($E_{\max} = 0,82 \pm 0,09$ g/g de tejido).

En arterias mesentéricas pre-contraídas con fenilefrina (10^{-5} M) las curvas concentración-relajación a ACh fueron desplazadas a la derecha en ratas diabéticas en comparación con las no diabéticas control ($-\log IC_{50}$ $7,59 \pm 0,12$ vs $7,14 \pm 0,11$, respectivamente, $P < 0,05$), sin embargo el E_{\max} no fue diferente y la relajación

alcanzó su máximo de la contracción a fenilefrina en ambos grupos. GW0742 restauró significativamente la respuesta inducida por ACh en ratas diabéticas ($-\log IC_{50}$ $7,48 \pm 0,07$, $P < 0,05$) sin tener efectos en los controles no diabéticos ($-\log IC_{50}$ $7,58 \pm 0,12$, $P < 0,05$; Fig. 19C).

2.4. Papel de los factores relajantes derivados de endotelio en los efectos vasculares de GW0742.

En arterias mesentéricas, el inhibidor de NOS, L-NAME (10^{-4} M) produjo un desplazamiento significativo hacia la derecha de la relajación inducida a ACh, tanto en ratas diabéticas como control (Figura 19D vs 19C). Sin embargo, en presencia del inhibidor, los anillos de animales diabéticos fueron significativamente más resistentes a la relajación en respuesta a ACh y el tratamiento con GW0742 falló para restaurar este daño en la respuesta relajante independiente de NO (Figura 19D). Cuando las arterias mesentéricas pre-contraídas con 80 mM de KCl, el cual despolariza el músculo liso vascular y suprime el efecto del factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), el E_{max} inducido por ACh estuvo fuertemente reducido en comparación a las ratas pre-contraídas con Phe (Figura 19E vs 19C). Esta relajación fue abolida por el L-NAME (datos no mostrados). En las arterias estimuladas con KCl, la curva de contracción-relajación a ACh estuvo también desplazada hacia la derecha en ratas diabéticas en comparación a ratas control ($-\log IC_{50}$ $7,67 \pm 0,06$ vs $7,20 \pm 0,14$; respectivamente, $P < 0,01$), con valores de E_{max} similares ($36,0 \pm 7,1$ vs $40,4 \pm 2,4$; respectivamente, $P > 0,01$) (Figura 19E). El tratamiento crónico con GW0742 restauró el daño en la respuesta relajante a ACh mediado por NO en arterias mesentéricas de ratas diabéticas pre-contraídas con KCl, incrementando también el E_{max} ($-\log IC_{50}$ $7,41 \pm 0,06$ y E_{max} $57,2 \pm 3,4$).

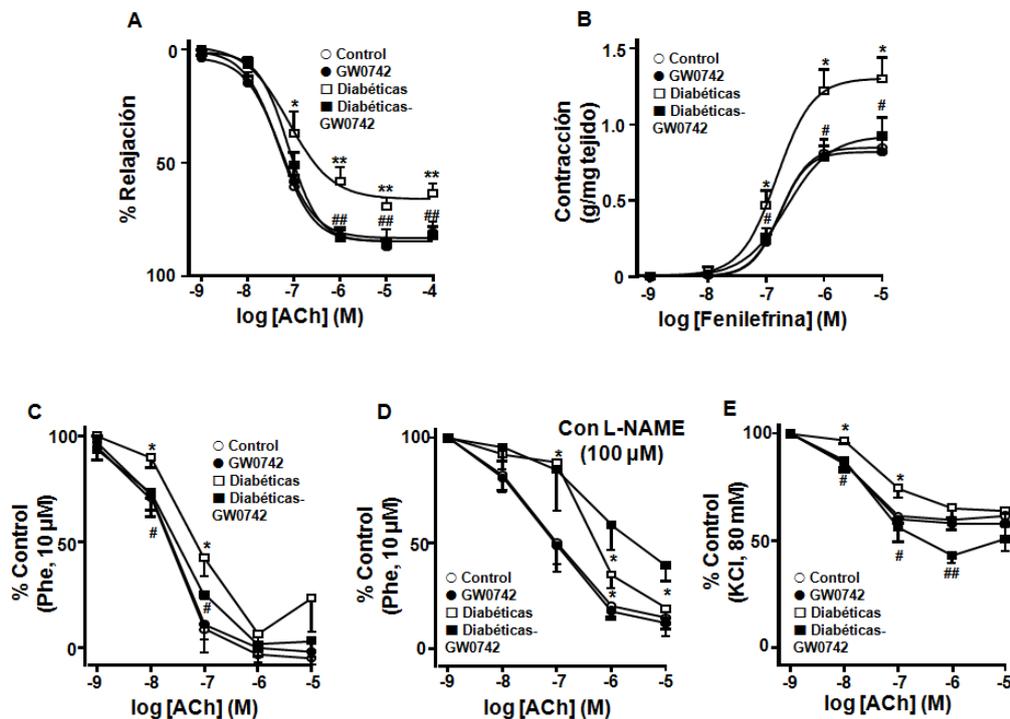


Figura 19. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial. Respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina (ACh, A) en aortas pre-contraídas por fenilefrina (Phe), y la respuesta contráctil inducida por Phe (B) en ratas no diabéticas y diabéticas. Respuesta relajante vascular inducida por ACh en arterias mesentéricas pre-contraídas por 10^{-5} M de Phe en ausencia (C) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M) y respuesta relajante inducida por ACh en arterias mesentéricas pre-contraídas por 80 nM KCl (E) en ratas no diabéticas y diabéticas. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ anillos de diferentes ratas). * y ** indican $P < 0,05$ and $P < 0,01$, respectivamente, diabéticas vs. control. # y ## indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente, diabéticas tratadas GW0742 vs. ratas diabéticas no tratadas.

En aorta, la respuesta vasodilatadora inducida por ACh fue completamente inhibida por L-NAME en todos los grupos experimentales (Figura 20A), demostrando que la relajación inducida por ACh en estos vasos tanto de ratas control como diabéticas fue completamente dependiente de NO derivado de

endotelio. Sin embargo, cuando los anillos fueron incubados previamente con el inhibidor de NOS, L-NAME, no se encontraron diferencias en la respuesta contráctil de contracción inducida por fenilefrina en anillos de aorta intactos de todos los grupos experimentales. (Figura 20B). Para analizar si el daño en la respuesta a NO derivado de endotelio es debido a una reducción en la biodisponibilidad de NO o debido a un defecto en la señalización de NO en el músculo liso vascular, nosotros analizamos los efectos de nitroprusiato, el cual activa directamente la guanilato ciclasa soluble en el músculo liso vascular, mimetizando los efectos de NO endógeno. No hubo diferencias entre los grupos en la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio a nitroprusiato (Figura 20C).

La expresión génica y proteica de eNOS (Figura 20D y 20E) y de la caveolina-1 (Figura 20F y 20G), un regulador alostérico negativo de la eNOS, en la aorta se encontraba marcadamente incrementada en ratas diabéticas en comparación con las aortas del grupo control.

El tratamiento con GW0742, durante 5 semanas, no afectó la expresión génica y proteica de eNOS (Figura 20D y 20E), ni la de caveolina-1 (Figura 20F y 20G). También se observaron disminuidos los niveles de fosforilación de eNOS (Figura 21A) y caveolina-1 (Figura 21B) en animales diabéticos en comparación con ratas control. GW0742 incrementó los niveles de fosforilación de ambas proteínas en ratas diabéticas así como también incrementó la fosforilación de la eNOS en animales control.

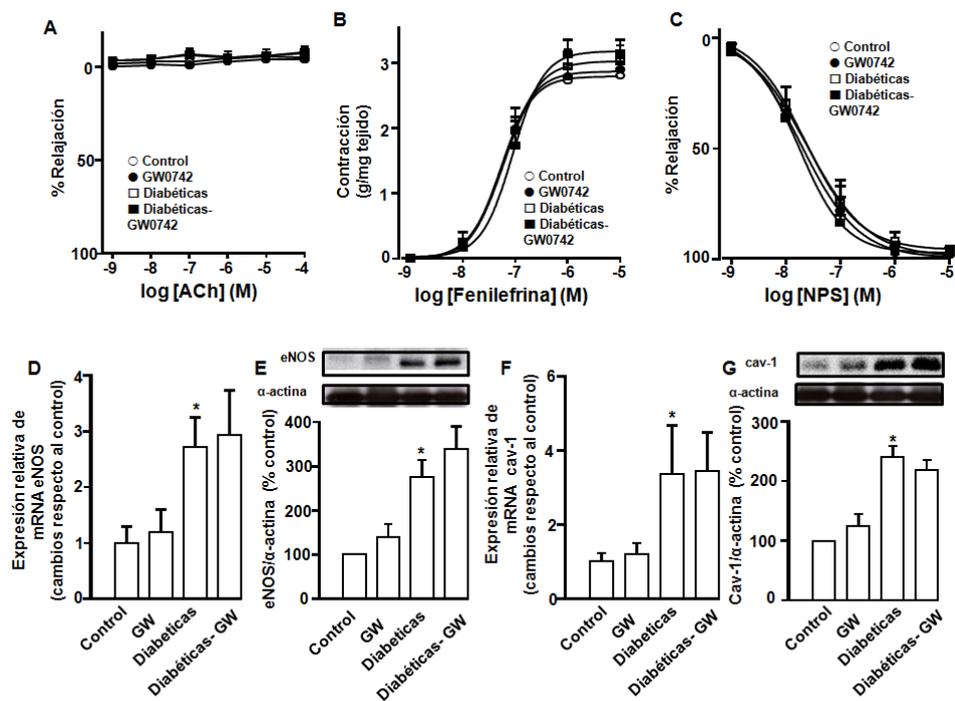


Figura 20. Efectos de GW0742 sobre la vía del NO en aorta de rata. Respuesta relajante vascular inducida por acetilcolina (ACh) (A) y la respuesta contráctil inducida por fenilefrina (Phe) (B) en presencia de L-NAME (10^4 M). Relajación inducida por nitroprusiato de sodio (NPS) (C) en aortas pre-contráidas con 10^{-6} M de Phe. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ anillos de diferentes ratas). Expresión de eNOS (D y E) y caveolina-1 (F y G) de mRNA por RT-PCR (D y F) y proteínas por western blot (E y G) en ratas control y diabéticas. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ anillos de diferentes ratas). Los datos (D y F) se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Se muestran bandas e histogramas que representan valores densitométricos normalizados con la correspondiente α -actina en western blot (B y D) ($n = 4-6$). * indica $P < 0,05$ diabéticas vs. control.

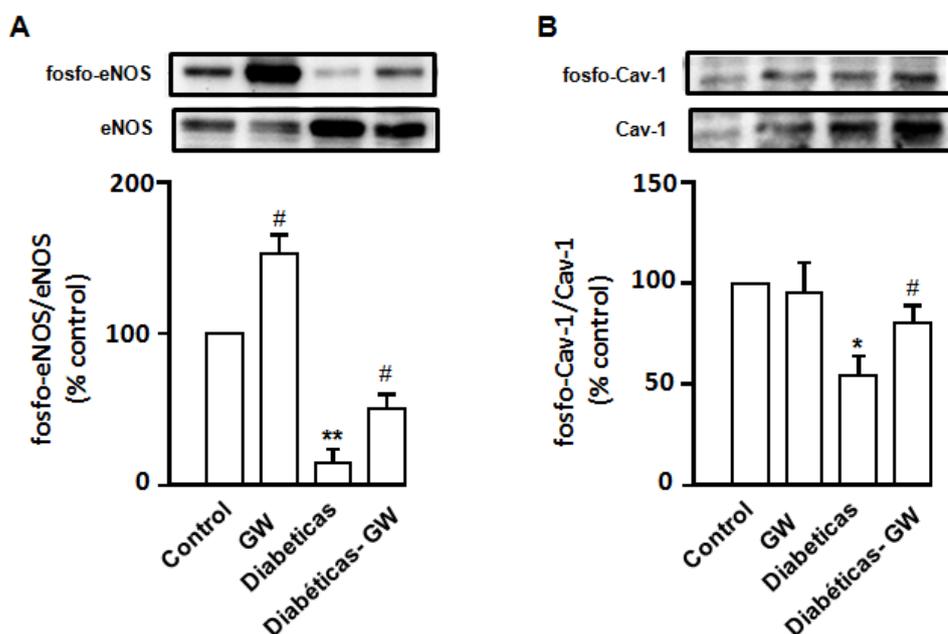


Figura 21. Efectos de GW0742 sobre la fosforilación de eNOS-Ser1177 (A) o caveolina-1-Tyr-14 (Cav-1) (B) en aorta de rata de todos los grupos experimentales. Se muestran bandas e histogramas que representan valores densitométricos normalizados con la α -actina en western blot (A y B) ($n= 4-6$). * y ** indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente, diabéticas vs. control. [#] indica $P < 0,05$, respectivamente, GW0742-tratadas vs. ratas no tratadas.

2.5. GW0742 reduce la producción de ROS vasculares en ratas diabéticas al reducir la actividad NAD(P)H oxidasa.

Para la caracterización y localización de los niveles de ROS en la pared vascular la fluorescencia roja del etidio fue analizada en secciones de aortas incubadas con dihidroetidio.

Se observaron núcleos positivos en rojo en la adventicia, media y las células endoteliales de las secciones de aorta que se incubaron con DHE (Figura 22A).

La fluorescencia nuclear roja del etidio se cuantificó y fue normalizada con la fluorescencia azul del marcador nuclear DAPI, lo que permite comparaciones entre diferentes secciones.

Los anillos de ratas diabéticas mostraron un marcado aumento en la tinción de la adventicia, media y las células endoteliales, en comparación con las ratas control y se redujo significativamente por GW0742; la tinción fue además suprimida en presencia de PEG-SOD (un scavenger de $O_2^{\cdot-}$) (Figura 22A y 22B).

La enzima NAD(P)H oxidasa es la mayor fuente de ROS en la pared vascular, por lo que se investigó el efecto de GW0742 sobre la actividad NAD(P)H oxidasa y la expresión génica de sus principales subunidades.

La actividad NAD(P)H oxidasa, se encontraba incrementada en anillos de aorta de ratas diabéticas en comparación con las ratas controles (Figura 23A). El tratamiento crónico con GW0742 redujo la actividad NAD(P)H oxidasa basal en ratas diabéticas.

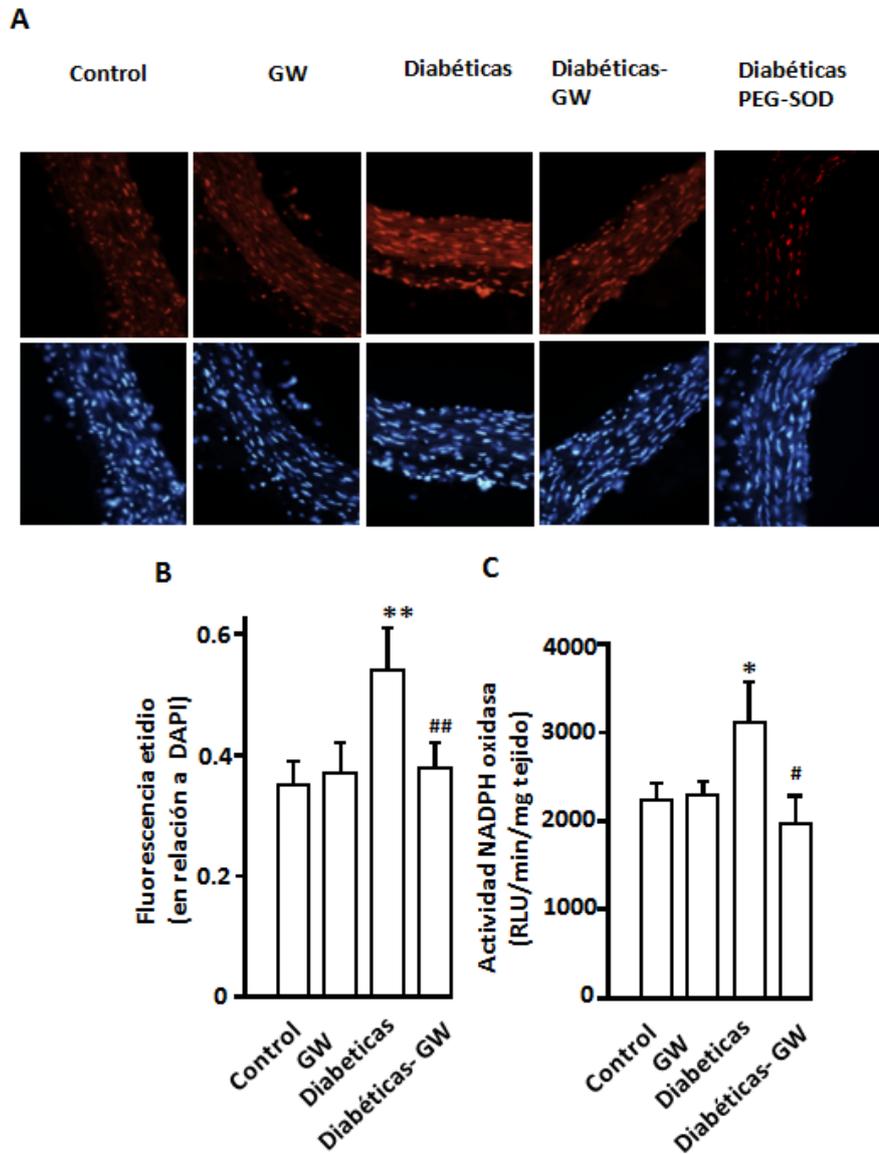


Figura 22. Efectos de GW0742 en la producción de ROS. (A) Las imágenes superiores muestran las arterias que se incubaron en presencia de DHE que produce una fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por ROS. Las inferiores muestran fluorescencia azul de la tinción nuclear con DAPI ($\times 400$ aumentos). (B) El promedio de los valores se expresó como la media \pm SEM ($n = 8-10$ anillos de diferentes ratas) de la fluorescencia roja de etidio normalizada con el azul fluorescente DAPI. La actividad NAD(P)H oxidasa fue medida con lucigenina por quimioluminiscencia (C) ($n = 6-10$). * y ** indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente, diabéticas vs. control.

y ## indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, GW0742-diabéticas tratadas vs. ratas diabéticas no tratadas, respectivamente.

Se observó una sobreexpresión proteica y génica de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa, p22^{phox} (Figura 23B y 23D), p47^{phox} (Figura 23C y 23G), NOX-1 (Figura 23D y 23H), en tejidos de aorta de ratas diabéticas comparada con ratas control sin cambios en la expresión génica de NOX-4 (Figura 23E) y en la expresión proteica de NOX-2 (Figura 23I). De igual forma, el tratamiento con GW0742 fue capaz de reducir la sobreexpresión génica de estas subunidades en ratas diabéticas.

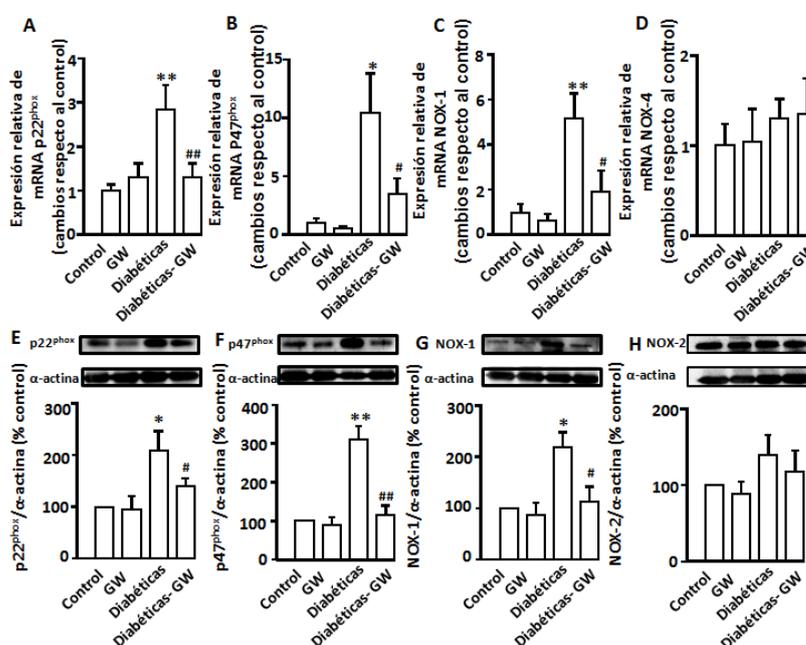


Figura 23. Efectos de GW0742 en la vía de la NAD(P)H oxidasa. Expresión de las subunidades de NAD(P)H oxidasa, p22^{phox} (A, E), p47^{phox} (B, F), NOX-1 (C, G) y NOX-4 (D) y NOX-2 (H) de mRNA por RT-PCR (A, B, C y D) y proteínas por western blot (E, F, G y H) en ratas diabéticas y no diabéticas. Se representan como un ratio de las unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) o se muestran bandas e histogramas que representan valores densitométricos normalizados con su correspondiente α -actina. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 9-10$) animales. * y ** indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, diabéticas vs. control, respectivamente. # y ## indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, GW0742-diabéticas tratadas vs. ratas diabéticas no tratadas, respectivamente.

2.6. Efectos de GW0742 sobre la infiltración de macrófagos.

Se analizó la actividad MPO en homogenados de tejido de aorta como un marcador de infiltración de macrófagos y neutrófilos. La actividad MPO fue similar en todos los grupos experimentales (Figura 24A). La inmunohistoquímica de macrófagos positivos a CD68 también demostró ausencia de infiltración de macrófagos en aortas de todos los grupos experimentales (Figura 24B).

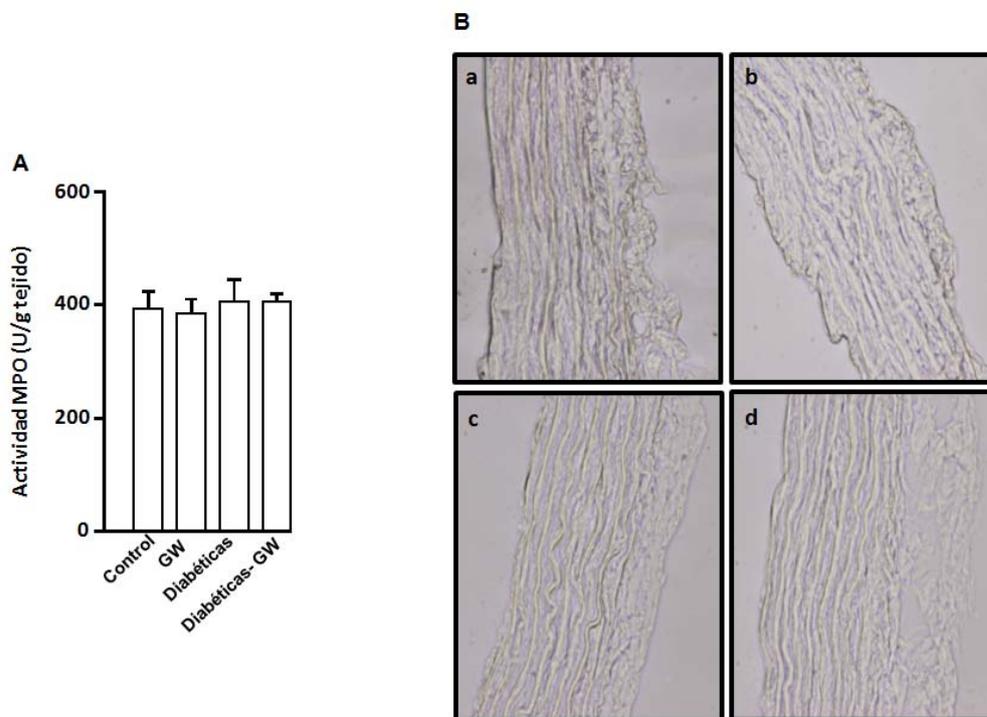


Figura 24. Efectos de GW0742 sobre la infiltración de macrófagos en la aorta. (A) Actividad mieloperoxidasa (MPO) en homogenados de aorta de todos los grupos experimentales. (B) Tinción representativa de la tinción de CD68 en un corte transversal de aorta de rata teñida con hematoxilina en control (a), GW0742 tratadas (b), diabéticas (c) y ratas diabéticas GW0742 tratadas (d). Cada histograma muestra la media \pm SEM ($n = 5-6$).

2.7. Efectos sobre ET-1.

La ET-1 juega un papel importante en la disfunción endotelial observada en la diabetes; los PPARs normalizan esta disfunción al mejorar la disrupción del sistema ET-1. Con el fin de determinar si existe una relación entre PPAR β y ET-1 en la pared vascular, se determinó la expresión génica de preproET-1 tras el tratamiento con GW0742.

La expresión de preproET-1 estaba incrementada en aorta de ratas diabéticas, y este incremento fue completamente normalizado por el tratamiento crónico con GW0742 (Figura 25).

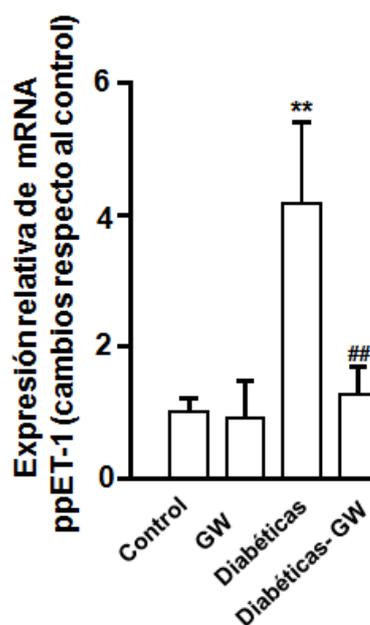


Figura 25. Efectos de GW0742 sobre la expresión de mRNA de ppET-1. Los niveles de mRNA de preproET-1 en aortas de ratas diabéticas y no diabéticas. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ experimentos). ** indican $P < 0,01$ diabéticas vs. control. ## indican $P < 0,01$ diabéticas tratadas GW0742 vs. ratas diabéticas no tratadas.

2.8. Papel de PPAR β en la disfunción endotelial inducida por elevados niveles de glucosa *in vitro*.

Para analizar la participación de la activación de PPAR β sobre los efectos protectores de GW0742 en la función endotelial, se llevaron a cabo una serie de experimentos en anillos de aorta incubados *in vitro* en medio bajo (5 mM) o alto (44 mM) en glucosa durante 6 horas en presencia o ausencia de GW0742 (1 μ M) y/o del antagonista PPAR β , GSK0660 (1 μ M). Las aortas incubadas con una concentración elevada de glucosa exhibieron una relajación a ACh significativamente menor comparada con aortas incubadas en condiciones de baja glucosa (Figura 19A). La misma concentración de manitol (5 mM glucosa + 39 mM manitol) no tuvo efecto sobre la relajación a ACh dependiente de endotelio, indicando que el daño producido por hiperglucemia no se debe a un efecto hiperosmótico. La coincubación con el ligando PPAR β , GW0742 no tuvo efecto en la respuesta de relajación a ACh en medio bajo en glucosa, pero incrementó esta respuesta relajante en condiciones de glucosa elevada (Figura 26A). La incubación previa con GSK0660 no modificó la relajación a ACh en condiciones de baja o alta glucosa, pero previno el incremento inducido por GW0742 en medio alto en glucosa (Figura 26B). Además, la regulación a la alza de mRNA ppET-1 (Figura 26C) y p47^{phox} (Figura 26D) inducida por alta glucosa estuvo también suprimida por GW0742, y este efecto protector fue prevenido por la coincubación con GSK0660.

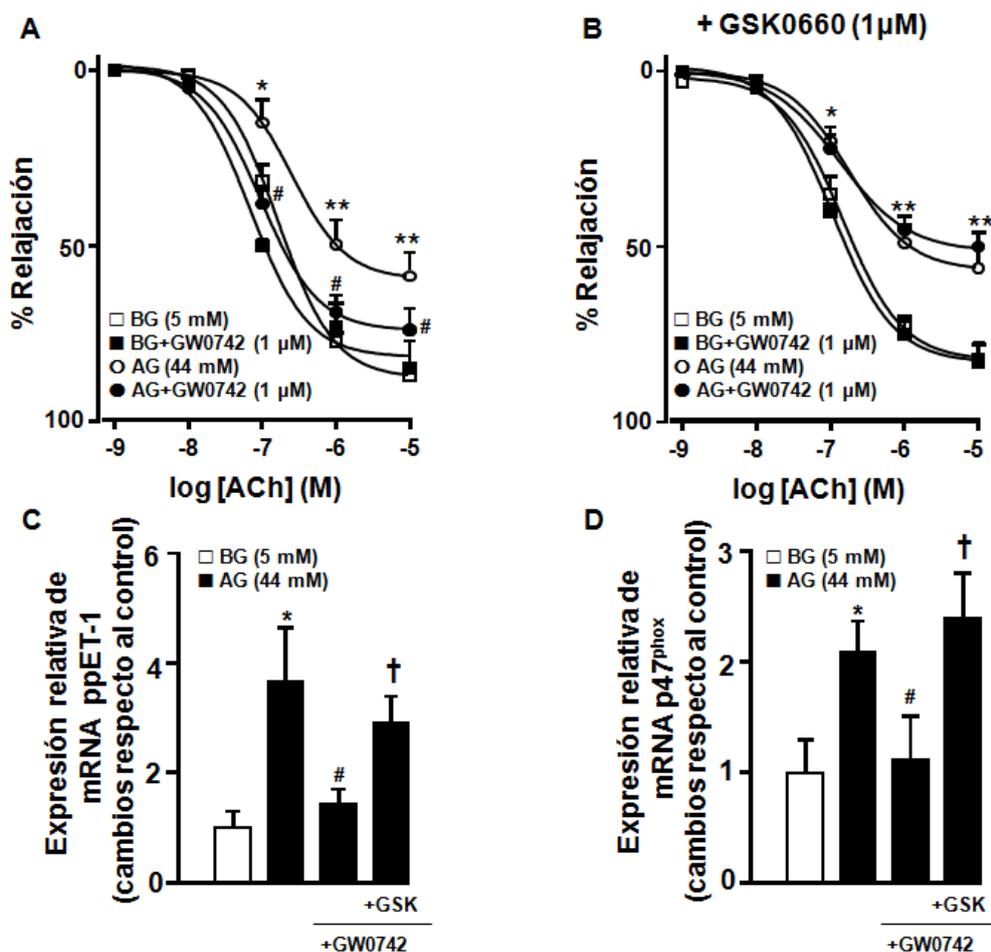


Figura 26. Efectos de GW0742 sobre la disfunción endotelial inducida por alta glucosa en anillos de aorta in vitro. Respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina (ACh) en anillos de aorta contraídos por 10^5 M fenilefrina después de 6 h de incubación in vitro en medio bajo (5 mM, BG) o alto (44 mM, AG) en glucosa con o sin GW0742 (1 μ M) y en ausencia (A) o en presencia (B) del antagonista de PPAR β , GSK0660 (1 μ M). Efecto de GW0742 sobre la expresión génica de ppET-1 (C) y de p47^{phox} (D). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ anillos de diferentes ratas). * y ** indican $P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente, alta vs. baja glucosa. # indica $P < 0,05$ alta glucosa GW0742- tratadas vs. alta glucosa no tratadas. † indica $P < 0,05$, GSK0660 + GW0742-tratadas vs. GW0742-tratadas.

Discusión.

Discusión

1. Efectos de los PPAR β sobre la disfunción endotelial inducida por hiperglucemia *in vitro*.

En condiciones fisiopatológicas un menor efecto de la insulina sobre el endotelio vascular puede dar lugar a disfunción endotelial, lo cual está correlacionado con un riesgo mayor de enfermedad arterial coronaria e incluso de la aparición de resistencia a la insulina (Rask-Madsen *et al.*, 2007). Varias líneas de investigación indican que la activación de PPAR β incrementa la sensibilidad a insulina (Leibowitz *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2003; Krämer *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2006; Coll *et al.*, 2010). Sin embargo, los mecanismos involucrados en estos efectos continúan sin conocerse. En esta Tesis Doctoral se observó por primera vez, que la activación de PPAR β en células endoteliales humanas es capaz de prevenir el daño en la ruta de señalización de la insulina inducido por alta glucosa para la producción de NO. Este efecto protector parece estar relacionado con la inhibición de la producción de ROS mitocondrial, posiblemente, como resultado de una reducción en la utilización de piruvato por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos a través de la inhibición de la piruvato deshidrogenasa por una regulación a la alza del gen diana de PPAR β , PDK4.

La unión de la insulina a su receptor (un receptor tirosina kinasa) resulta en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS)-1, que se une y activa a la PI3K, fosforilando y activando a la protein kinasa dependiente de 3-fosfoinositol (PDK)-1 vía incremento en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. PDK-1, a su vez, fosforila y activa a la proteína kinasa B (Akt), la cual fosforila directamente a la eNOS en la posición ser-1177, resultando en un incremento de la actividad eNOS

y de la síntesis de NO (Figura 27). En células endoteliales incubadas con concentraciones elevadas de glucosa la producción de NO estimulada por insulina se ve afectada (Schnyder *et al.*, 2002; Salt *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005), sin embargo los mecanismos por los que lo causa todavía no han sido caracterizados. Se ha propuesto que la alta glucosa reduce la expresión basal de la eNOS, su actividad, y la producción de NO en cultivos de células endoteliales (Ding *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2001). La hiperglucemia induce un incremento en la producción de las ROS, en la O-glicosilación de N-acetil-glucosamina, en la actividad de la PKC, y en la formación de productos finales de la glicación avanzada, y todo ello conduce a la inhibición específica de la ruta PI3K/Akt/eNOS (Wallis *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2003). ROS disminuyen la biodisponibilidad de NO, reducen los niveles celulares de tetrahidrobiopterina, y promueven la generación de O_2^- por la eNOS desacoplada. La O-glicosilación de N-acetil-glucosamina de la eNOS en el sitio de la fosforilación de la Akt ser1179 afecta a la actividad de la eNOS (Du *et al.*, 2005). Los productos finales de glicación avanzada incrementan la formación de ROS, las cuales disminuyen la biodisponibilidad del NO y la expresión de eNOS por aceleración de la degradación de su mRNA (Goldin *et al.*, 2006). Además, la estimulación con alta glucosa inhibe la producción de NO estimulada por insulina como resultado de una disminución en la fosforilación de la serina de la eNOS mediada por Akt en HUVECs (Schnyder *et al.*, 2002) y en células endoteliales de aorta bovina (Du *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, existen otros estudios donde se ha observado que la alta glucosa inhibe la síntesis de NO estimulada por insulina regulando a la baja algunos aspectos de la señalización de la insulina., por ejemplo la ruta de señalización de la CAP-Cbl, lo cual no conlleva a una reducción en la fosforilación de la ser-1177 de la eNOS mediada por Akt (Salt *et al.*, 2003). Por otra parte, la hiperglucemia incrementó la producción de ROS mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 2000), la cual, a su vez, modifica la vía de señalización de IRS-1/Akt/eNOS, por la fosforilación de la serina-636 de IRS-1 reduciendo la unión

de la subunidad de regulación p85 de la PI3K a IRS-1 y promoviendo la resistencia a la insulina (Esposito *et al.*, 2001). De hecho, la sobreexpresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) redujo la producción de ROS mitocondrial y mejoró el daño en la señalización de la insulina Akt-eNOS en hiperglucemia (Du *et al.*, 2001).

En nuestras condiciones experimentales la incubación en condiciones de alta glucosa redujo tanto la producción de NO dependiente de insulina como la fosforilación de la (Ser473)-Akt y la (Ser1177)-eNOS en comparación con las células expuestas a baja glucosa. Este efecto inducido por hiperglucemia está limitado a la síntesis de NO estimulada por insulina, ya que la estimulación de eNOS mediada por calcio inducida por el ionóforo de calcio A23187 fue similar a cualquier concentración de glucosa en el medio. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral están en concordancia con la hipótesis que involucra el incremento en la producción de ROS mitocondrial y la subsecuente fosforilación de la ERK1/2 y fosforilación de la serina-636 de IRS-1 en el daño de la producción de NO inducido por alta glucosa (Figura 27). Esto está respaldado por varios hallazgos. 1) La hiperglucemia incrementó la producción de ROS mitocondrial, que fue inhibida por TTFA, un inhibidor del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y CCCP, un desacoplante de la fosforilación oxidativa que inhibe el gradiente de protones de la membrana mitocondrial, demostrando que las ROS intracelulares inducidas por hiperglucemia son producidas por el gradiente de protones electromecánicos generados por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Nishikawa *et al.*, 2000). Ambos inhibidores mitocondriales de ROS, TTFA y CCCP, incrementaron la producción de NO estimulada por insulina en células incubadas en medio alto en glucosa. 2) De acuerdo con resultados previos (Chen *et al.*, 2007), la alta glucosa incrementó la fosforilación de la ERK1/2 la cual fue inhibida por TTFA y la catalasa, involucrando las ROS mitocondriales, principalmente el H₂O₂

como principal mediador de este efecto. La inhibición de la ERK1/2 por el PD98059 también incrementó la producción de NO estimulada por insulina en HUVECs incubadas en medio alto en glucosa, sin presentar efecto el inhibidor de la JNK, SP600125. 3) La fosforilación de la serina de IRS-1 fue estimulada por la hiperglucemia e inhibida por el inhibidor de la ERK1/2, PD98059.

La activación de PPAR β mejoró los defectos en la señal de insulina para producir NO inducido por hiperglucemia. Esto está respaldado por lo siguiente: i) los agonistas PPAR β , GW0742 y L165041, incrementaron la producción de NO estimulada por insulina en células cultivadas en alta glucosa, sin presentar efecto en las células incubadas en baja glucosa. Esta mejoría en la función endotelial estuvo acompañada de un incremento de la fosforilación de la Akt y eNOS. Estos resultados están en concordancia con el mecanismo de acción fisiológico de la insulina sobre el endotelio vascular el cual está predominantemente mediado por la ruta IRS/PI3K/Akt, llevando a la activación de eNOS por la fosforilación de la (Ser1177)-eNOS (Zeng *et al.*, 1996). Tanto los efectos de expresión como funcionales inducidos por ambos agonistas fueron prevenidos cuando las HUVECs fueron incubadas con el antagonista de PPAR β , GSK0660. Por otra parte, el siRNA específico de PPAR β también inhibió el efecto protector de los agonistas PPAR β en la producción de NO estimulada por insulina. Este efecto protector en la producción de NO no se limita únicamente a la activación de PPAR β , ya que efectos similares presentaron el agonista PPAR α , clofibrato y PPAR γ , ciglitazona.

Varios mecanismos se han implicado en los efectos protectores de los agonistas PPAR β en la resistencia a insulina, tales como la activación de AMPK (Barroso *et al.*, 2011), la inhibición de la ERK1/2 (Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008), y la activación de CPT-1 (Coll *et al.*, 2010). La AMPK es un sensor metabólico que detecta niveles bajos de ATP lo que conduce al incremento del metabolismo oxidativo (Reznick y Shulman, 2006) por reducción de los niveles de malonil-

CoA, los cuales inhiben la actividad de la CPT-1. En este estudio se hipotetizó que la alta glucosa incrementa la síntesis de ATP en la mitocondria, llevando a la inhibición de AMPK (Lv *et al.*, 2012) lo cual a su vez, induce la reducción en la fosforilación de la Ser-1177 de la eNOS y la bioactividad (Thors *et al.*, 2008). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no encontramos cambios en la fosforilación y la activación de AMPK. El PPAR β , GW501516 incrementó la ratio AMP/ATP en el hígado (Barroso *et al.*, 2011) y en células del músculo esquelético (Krämer *et al.*, 2007) incrementando la fosforilación de AMPK. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral en HUVECs, en condiciones de hiperglucemia, están en desacuerdo con estas evidencias previas, ya que el tratamiento con GW0742 o L165041 no incrementó significativamente la fosforilación de AMPK y tampoco hubo cambios en la mejoría de la producción de NO estimulada por insulina por parte de ambos agonistas PPAR β , cuando se inhibía la AMPK por el compuesto C, demostrando que la AMPK no estaba involucrada en este efecto protector.

Como se ha descrito previamente la activación de la ERK1/2 parece estar involucrada en el daño de la señalización de la insulina inducida por alta glucosa, posiblemente, incrementando la fosforilación de la serina/treonina de componentes claves en la ruta de señalización de la insulina, tal como IRS-1. En nuestros experimentos, ambos agonistas PPAR β redujeron la activación de ERK1/2 inducida por hiperglucemia en HUVECs, y también fueron capaces de prevenir el incremento en la fosforilación de la serina de IRS-1. Estos datos en células endoteliales confirman que los PPAR β regulan los niveles de fosforilación de la ERK1/2 en varios tejidos. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los PPAR β controlan la activación de la ERK1/2 no se conocen. Se ha descrito un cruce inhibitorio entre la ERK1/2 y la AMPK (Du *et al.*, 2008), el cual debería ser descartado en nuestros estudios ya que ambos agonistas PPAR β no incrementaron la AMPK. La ERK1/2, es una serina/treonina protein kinasa

sensible a estrés, cuya fosforilación/activación fue inhibida por TTF α , y catalasa, involucrando las ROS mitocondriales como un estímulo celular para la activación de la ERK1/2. En los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, la activación de PPAR β provoca la inhibición de ROS mitocondrial y a la subsecuente prevención en la fosforilación tanto de la ERK1/2 como de IRS-1 (Figura 27).

La oxidación de la glucosa intracelular comienza con la glucólisis en el citoplasma, generándose NADH y piruvato. El piruvato es transportado dentro de la mitocondria donde es oxidado por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos dando como resultado dióxido de carbono, agua, cuatro moléculas de NADH y una molécula de FADH₂. La NADH y la FADH₂ mitocondrial proveen energía para producir ATP por la fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones. La inhibición del transporte de piruvato derivado de la glucólisis dentro de la mitocondria inhibió completamente la producción de ROS de la mitocondria inducida por hiperglucemia, indicando que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos es la principal fuente de incremento de generación de ROS inducido por hiperglucemia (Nihikawa *et al.*, 2000). El complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial posee un papel estratégico en el metabolismo intermediario, catalizando la descarboxilación oxidativa irreversible del piruvato a acetil-CoA, uniendo de este modo la ruta de la glucólisis a la ruta oxidativa del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La PDK4 es una enzima clave que media el movimiento desde la glucólisis hacia el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos vía fosforilación de la piruvato deshidrogenasa y la subsecuente inactivación (Patel y Korotchkina, 2006). PPAR β es un regulador clave de los genes de PDK, en particular de PDK4 (Degenhardt *et al.*, 2007). De hecho, encontramos que ambos agonistas PPAR β incrementan de manera concentración dependiente los niveles de mRNA de PDK4 en HUVECs tanto en medio bajo como alto en glucosa, y fue inhibido por el bloqueo de los PPAR β con GSK0660. También se ha observado que PDK4 juega un papel clave en el efecto beneficioso

de la activación de PPAR β en la mejora de la vía de la insulina para la producción de NO (Figura 27). Primero, la inhibición de PDK4 por DCA suprimió el efecto inhibitorio de L165041 en la producción incrementada de ROS mitocondrial inducida por hiperglucemia. Segundo, el DCA también inhibió el incremento en la producción de NO mediada por insulina inducida por la activación de PPAR β en medio alto en glucosa.

En resumen, sobre la base de nuestros resultados, nosotros proponemos que la activación de PPAR β mejora la ruta Akt-eNOS, resultando en un incremento en la producción de NO estimulada por insulina en HUVECs incubadas en alta glucosa, al menos en parte, por activación de PDK4. Este efecto debería reducir el transporte del piruvato dentro de la mitocondria, normalizando la generación de ROS mitocondrial, llevando a la inactivación de la fosforilación de la ERK1/2 y la subsecuente mejora de la señalización de Akt-eNOS estimulada por insulina. Teniendo en cuenta que la señalización de insulina en las células endoteliales juega un papel fundamental en la regulación de la captación de glucosa por el músculo esquelético (Kubota *et al.*, 2011), la activación de PPAR β , que mejora la señalización de la insulina, puede servir como una estrategia terapéutica para mejorar la resistencia a la insulina en el músculo esquelético.

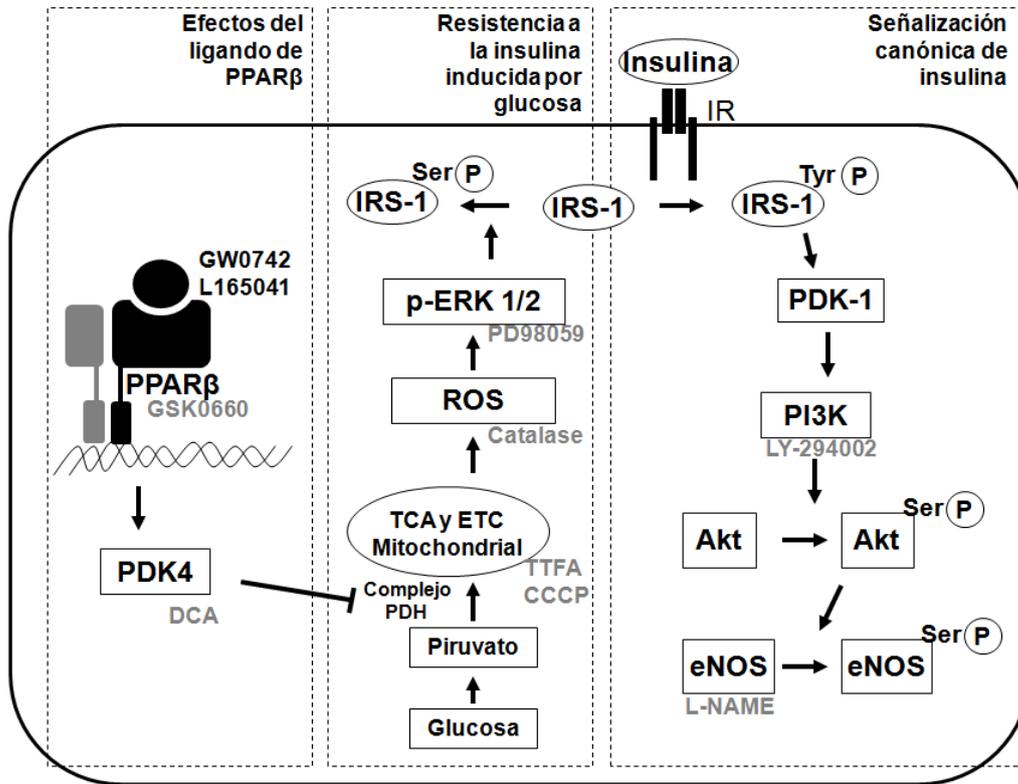


Figura 27. Esquema propuesto de la activación de PPARβ sobre la mejora de la alteración de la señal de insulina inducida por hiperglucemia en células endoteliales.

2. La activación de PPAR β previene la disfunción endotelial en ratas diabéticas tipo 1.

En esta Tesis Doctoral se demuestra por primera vez que el tratamiento crónico con el agonista altamente selectivo de PPAR β , GW0742 mejora la relajación dependiente de endotelio en aorta y en pequeñas arterias mesentéricas en diabetes mellitus tipo 1. Se eligió el modelo de diabetes tipo 1 inducida por STZ caracterizado por: (1) una menor respuesta de relajación dependiente de endotelio inducida por ACh en diferentes lechos vasculares (Kamata *et al.*, 1989; Kobayashi y Kamata, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000; Kamata y Kobayashi, 2000; Kanie *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2007; Kanie y Kamata 2002; Lopez-Lopez *et al.*, 2008), (2) una disminución en la producción de NO (Hink *et al.*, 2001; Wendt *et al.*, 2005), y GMPc (Kamata *et al.*, 1989; Matsumoto *et al.*, 2007), (3) una respuesta vascular defectuosa a EDHF en arterias de resistencia (Makino *et al.*, 2000; Wigg *et al.*, 2001) (4) un incremento en la generación de O $_2^-$ (Hink *et al.*, 2001; Kamata y Kobayashi, 1996; Matsumoto *et al.*, 2007; Kanie y Kamata, 2002; Lopez-Lopez *et al.*, 2008; Wendt *et al.*, 2008), y (5) disminución en la expresión de mRNAs para PPAR- α y PPAR- γ , así como un incremento en la expresión génica de PPAR β en aorta (Kanie *et al.*, 2003).

Previamente fue descrito por nuestro grupo que GW0742 presentaba un efecto beneficioso en la función endotelial en modelos SHR, lo cual estaba relacionado con una mejora de la tolerancia a glucosa, incremento de HDL y un efecto directo en la pared vascular, reduciendo la producción de O $_2^-$ estimulada por angiotensina II (Zarzuelo *et al.*, 2011). En ratas diabéticas, las concentraciones plasmáticas de lípidos y glucosa están incrementadas (Kobayashi *et al.*, 2000; Hink *et al.*, 2001; Kanie *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2007; Kanie y Kamata, 2002). En el presente estudio GW0742 redujo los niveles plasmáticos de triglicéridos sin afectar la glucosa plasmática y el colesterol total. Desde que, niveles elevados de

triglicéridos (Kamata y Yamashita, 1999) y bajos de HDL (Van Linthout *et al.*, 2009) están asociados a disfunción endotelial, los cambios inducidos por el GW0742 en estos parámetros podrían explicar la mejora en la función endotelial en ratas diabéticas. Sin embargo, la mayoría de las complicaciones que aparecen en la diabetes están relacionadas con el incremento de la glucosa plasmática y el aumento en la generación de ROS, lo cual también puede provocar disfunción endotelial (Kamata y Kobayashi, 1996; Takenouchi *et al.*, 2010).

En esta Tesis Doctoral demostramos, que GW0742 también fue capaz de prevenir tanto la disfunción endotelial como la regulación a la alza de ppET-1 y p47^{phox} inducido por alta glucosa *in vitro*, sugiriendo que tanto la hiperglucemia como el GW0742 ejercen efectos directos sobre la pared vascular, independientemente de los cambios en los niveles de lípidos. Además, estos efectos protectores inducidos por GW0742 se ha visto que están relacionados con la activación de PPAR β al ser suprimidos por el antagonista de PPAR β , GSK0660. Por otro lado, se observó que el tratamiento crónico con GW0742 incrementó la expresión vascular de dos genes diana de PPAR β , PDK-4, que reduce la oxidación de la glucosa por inhibición del complejo piruvato deshidrogenasa dando lugar a un incremento en la utilización de ácidos grasos, y CPT-1 involucrada en la β -oxidación de ácidos grasos (Tanaka *et al.*, 2003).

Los estudios realizados *in vitro* en anillos aórticos aislados son problemáticos para compararlos con los estudios *in vivo* porque las concentraciones de glucosa usadas (44 mM), son mucho más elevadas que los niveles alcanzados *in vivo* en ratas diabetizadas con STZ. Por lo tanto es difícil hacer extensivo los cambios vistos *in vitro* en arterias incubadas en alta glucosa durante 6 horas a aquellos obtenidos *in vivo* en animales diabéticos crónicos.

Varios estudios de diferentes laboratorios han demostrado que la presión arterial está alterada en modelos de animales diabéticos. Sin embargo, los resultados no son consistentes, puesto que se ha descrito que se incrementa

(Majithiya *et al.*, 2005), disminuye (Makino y Kamata, 2000), o no varía (Tone *et al.*, 2005) la presión arterial. Las razones para estas discrepancias no están claras, pero tal variabilidad se atribuye generalmente a diferencias en el diabetógeno utilizado, el sexo, las especies y/o cepas de los animales, el animalario, la duración de la hiperglucemia, y/o las técnicas de medición de la presión arterial así como las condiciones experimentales. En el presente estudio la PAS fue similar en ratas diabéticas por STZ y ratas controles de edad similar, y no fue modificada por la activación de PPAR β , una observación respaldada por trabajos previos, que demuestran que el tratamiento con GW0742 no influye en la presión sistólica en ratas normotensas (Harrington *et al.*, 2010), sin embargo reduce la presión en animales hipertensos (Zarzuelo *et al.*, 2011).

Ratas tratadas con STZ presentan disfunción endotelial en arteria pulmonar, aumento de la presión arterial pulmonar, e hipertrofia del ventrículo derecho (Lopez-Lopez *et al.*, 2008; Al-Shafei *et al.*, 2002). En el presente estudio también se observó hipertrofia del ventrículo derecho en las ratas diabéticas, la cual se redujo por el tratamiento crónico con GW0742, que podría deberse a una mejora en la función de la arteria pulmonar. Esto concuerda con el beneficio terapéutico de GW0742 en un modelo de hipertensión arterial pulmonar en rata inducida por hipoxia crónica (Harrington *et al.*, 2002).

La contribución de agentes vasoactivos en la regulación endotelial del tono de los vasos sanguíneos, varía dependiendo del tipo de vaso, edad, sexo y especies animales. En la aorta de rata, el NO es el principal responsable de la relajación dependiente de endotelio (Vanhoutte *et al.*, 1985) como se ha observado en este estudio por la acción inhibitoria total del L-NAME. Por consiguiente, la disminución de la relajación inducida por ACh indica una menor bioactividad de NO. Además, el incremento en la respuesta contráctil a fenilefrina en la aorta de ratas diabéticas fue suprimida por la presencia de L-NAME, indicando que la bioactividad basal de NO se encontraba disminuida. El tratamiento crónico con

GW0742 fue capaz de prevenir la alteración de la respuesta a ACh y a fenilefrina observada en aortas diabéticas, indicando un papel protector del agonista tanto en la bioactividad basal de NO como en la inducida por la ACh.

En arterias mesentéricas tanto el NO como el EDHF contribuyen a la relajación dependiente de endotelio, mientras que los metabolitos derivados de la COX no juegan aparentemente ningún papel (De Vriese *et al.*, 2000; Wigg *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2006). Estos resultados están en concordancia con los efectos inhibitorios observados en este estudio del inhibidor de NOS, L-NAME y niveles elevados de K⁺ (herramientas farmacológicas estandarizadas para inhibir el NO y el EDHF, respectivamente). La relajación inducida por ACh también se encuentra reducida en arterias mesentéricas de ratas diabéticas (Heygate *et al.*, 1995; resultados de nuestro estudio), pero los mecanismos involucrados son controvertidos. Una alteración selectiva en la ruta del NO (Shi *et al.*, 2006) o del EDHF (Wigg *et al.*, 2001) o de ambas simultáneamente (Leo *et al.*, 2011) han sido publicadas. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, demuestran que en presencia de L-NAME o alto K⁺ las vasodilataciones residuales estaban reducidas en ratas diabéticas, indicando que ambas rutas se encontraban alteradas. El tratamiento crónico con GW0742 mejora la relajación en ausencia o en presencia de niveles elevados de K⁺ en arterias mesentéricas. Sin embargo, este agonista PPAR β no presentó ningún efecto después de la inhibición de eNOS indicando que actúa sobre el NO, pero no afecta al efecto de EDHF en la vasodilatación inducida por ACh.

La activación de la ruta de NO dependiente de endotelio por ACh para inducir relajación requiere: 1) Activación de la eNOS dependiente de Ca²⁺ en células endoteliales provocando la síntesis de NO, 2) La difusión de NO a las células del músculo liso adyacentes, 3) La activación de la guanilato ciclasa soluble inducida por NO, activando la síntesis de GMPc, y 4) La activación de la proteína Kinasa G. Todos estos pasos en la ruta de señalización del NO en la vasculatura sistémica

pueden verse alterados en condiciones de alta glucosa *in vitro* y/o diabetes tipo 1 y tipo 2 *in vivo* (Jay *et al.*, 2005; Wendt *et al.*, 2005; Zanetti *et al.*, 2005). En los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, la respuesta relajante al activador de la guanilato ciclasa soluble, nitroprusiato, fue similar en aortas de ratas control y diabéticas, tratadas y no tratadas con GW0742, indicando que las alteraciones en los dos últimos pasos mencionados previamente no parecen contribuir con la disfunción endotelial en diabetes o su prevención por GW0742. Así, los cambios funcionales observados en la relajación dependiente de endotelio en aortas diabéticas podrían deberse a una alteración en la síntesis de NO o su biodisponibilidad.

Por otra parte, cambios en la expresión de eNOS en ratas diabéticas por STZ son contradictorios. Existen estudios donde se demuestra un incremento, disminución y/o bien no se modifica la expresión de eNOS en distintos vasos sistémicos (Hink *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2007; Wendt *et al.*, 2005; Zanetti *et al.*, 2005). Nuestros resultados demuestran que tanto los niveles de mRNA como de la proteína eNOS fueron regulados a la alza en aortas de animales diabéticos comparado con los controles. Sin embargo, el incremento en su regulador alostérico negativo, caveolina-1 también podría contribuir para explicar la reducción en la producción de NO encontrada por otros autores en anillos aórticos diabéticos (Hink *et al.*, 2001; Wendt *et al.*, 2005). De nuevo, GW0742 no fue capaz de modificar la expresión de eNOS y caveolina-1. También se observó una disminución en los niveles de fosforilación de la eNOS y la caveolina-1 en animales diabéticos en comparación con ratas controles. GW0742 incrementó los niveles de fosforilación de eNOS tanto en ratas diabéticas como en controles. El incremento en la fosforilación de eNOS estaría involucrada en la producción de NO. Por otro lado, la activación de eNOS promueve la fosforilación de la Tyr-14 de la caveolina-1 dependiente de Scr y la unión de la eNOS/caveolina-1, lo que origina por mecanismo de retroalimentación negativo, una inhibición de la eNOS

(Chen *et al.*, 2012). En nuestros experimentos, cuando la biodisponibilidad del NO es limitada, como ocurre en ratas diabéticas, los niveles de fosfo-caveolina-1 se encontraban también disminuidos en comparación a los controles. GW0742, que incrementó la generación de NO en animales diabéticos también aumentó la fosforilación de la caveolina-1.

Un mecanismo clave en la disfunción endotelial involucra la producción vascular de ROS, particularmente $O_2^{\cdot-}$, que reacciona rápidamente con el NO y lo inactiva (Tschudi *et al.*, 1996). Existen numerosas evidencias que sugieren que la disminución en la relajación dependiente de endotelio observada en diabetes involucra la inactivación de NO por $O_2^{\cdot-}$ (De Vriese *et al.*, 2000; Jay *et al.*, 2005; Spitaler y Graier, 2002). En la aorta de ratas diabéticas se observó un incremento en la fluorescencia roja a DHE. DHE puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ y otros oxidantes celulares para generar dos compuestos fluorescentes 2-hidroxi-etidio y etidio, respectivamente (Zielonka *et al.*, 2010). Si bien es cierto que la fluorescencia roja derivada de 2-hidroxi-etidio y etidio no puede ser completamente determinada. No obstante, el efecto inhibitorio de los “scavengers” de $O_2^{\cdot-}$, tirón y PEG-SOD sugieren que la fuente primaria de estrés oxidativo es probablemente el $O_2^{\cdot-}$. El tratamiento crónico con GW0742 redujo este incremento en animales diabéticos.

La NADPH oxidasa, un complejo multienzimático formado por gp91^{phox} o sus homólogos vasculares NOX-1, NOX-4, rac, p22^{phox}, p47^{phox}, y p67^{phox}, es considerada la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ en la pared vascular. Múltiples evidencias sugieren que la NADPH oxidasa vascular es la principal fuente de incremento de ROS por alta glucosa *in vitro* (Liu *et al.*, 2007), en modelos de animales diabéticos (Hink *et al.*, 2001; Lopez-Lopez *et al.*, 2008), y en pacientes diabéticos (Guzik *et al.*, 2002). En los resultados presentados en esta Tesis Doctoral hemos encontrado un incremento marcado en la expresión de mRNA de p22^{phox}, p47^{phox}, y NOX-1, asociado con un aumento significativo en la actividad de NADPH oxidasa en

aortas de ratas diabéticas, así como un incremento en $p47^{\text{phox}}$ en anillos aórticos incubados en condiciones de alta glucosa. GW0742 inhibió la regulación a la alza de estas subunidades y el incremento en la actividad de la NADPH oxidasa en animales diabéticos sin efectos en las ratas control. La desregulación de la actividad de la eNOS en condiciones asociadas con estrés oxidativo ha sido también relacionada con un desacoplamiento de la eNOS por pérdida de la tetrahidrobiopterina. Por consiguiente, podría ser posible que el primer lugar de regulación no esté en la capa del músculo liso, sino en el endotelio donde la NOX-2 debe estar también disregulada. Sin embargo, nosotros no encontramos cambios significativos en la expresión proteica de NOX-2 en las aortas de todos los grupos experimentales, excluyendo por tanto esta posibilidad. Por lo que se sugiere que la reducción de O_2^- derivada de la actividad de la NADPH oxidasa en la pared vascular, y la subsecuente prevención de la inactivación del NO, constituye el principal mecanismo involucrado en sus efectos protectores de la función endotelial.

Publicaciones previas han involucrado la ET-1 en el desarrollo de la producción de O_2^- y la disfunción endotelial en ratas diabéticas. Esto se basa en los siguientes hechos: (1) los niveles plasmáticos de ET-1 están incrementados en ratas diabéticas por STZ, principalmente debido a una sobreexpresión del mRNA de ppET-1 (Makino *et al.*, 2000; Makino y Kamata, 1998), (2) la sobreproducción de ET-1 observada en ratas diabéticas por STZ se debe a hiperglucemia, no a ningún incremento en el colesterol LDL o triglicéridos (Makino y Kamata, 2000), (3) el incremento en la expresión de mRNA de $p22^{\text{phox}}$ observado en ratas diabéticas por STZ es completamente prevenido por la administración crónica de J-104132 (antagonistas de receptores de ETA y ETB) (Kanie y Kamata, 2002), y (4) un prolongado tratamiento con ET-1 daña la función endotelial en la aorta tanto en ratas no diabéticas como en ratas con una diabetes inducida por STZ, un efecto que puede estar relacionado con la generación de O_2^- (Matsumoto *et al.*,

2007; Romero *et al.*, 2010). En los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, también se observa una sobreexpresión de mRNA de ppET-1 en aorta de ratas diabéticas por STZ, prevenida por el tratamiento crónico con GW0742. La regulación a la baja de PPAR α y PPAR γ en la aorta contribuye, a través del sistema de ET-1, a la disfunción endotelial observada en ratas diabéticas por STZ. En efecto, la administración crónica de bezofibrato (un agonista PPAR α) a ratas diabéticas por STZ incrementó la expresión de PPAR α y PPAR γ , y normalizó también el mRNA de ppET-1 y la concentración plasmática de ET-1, mejorando la relajación dependiente de endotelio (Kanie *et al.*, 2003). De manera análoga, el tratamiento crónico con pioglitazona (un agonista PPAR γ) normalizó esta disfunción por mejora del sistema ET-1 (Matsumoto *et al.*, 2007). En los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, GW0742, incrementó la expresión en aorta de PPAR β , pero no la de PPAR α o la de PPAR γ , también normalizó la expresión de ppET-1, indicando que la activación de PPAR β podría también regular la producción de ET-1 vascular. Además, la regulación a la alza de ppET-1 inducida por alta glucosa *in vitro*, fue prevenida por GW0742 a través de la activación de PPAR β , puesto que este efecto fue también inhibido por el antagonista de PPAR β , GSK0660. Por consiguiente estos resultados sugieren que GW0742 normaliza la disfunción endotelial en diabetes al mejorar la vía de ET-1. Sin embargo, otros cambios en la diabetes, incluyendo incremento local y sistémico de la producción de angiotensina, incremento en la actividad PKC, disminución de la SOD, incremento en la producción mitocondrial de ROS, etc, han sido también descritos que pueden incrementar la actividad de la NADPH oxidasa y/o la producción de ROS. La contribución potencial de estos otros factores y los posibles efectos del GW0742 no se han analizado en este estudio.

En conclusión, estos resultados demuestran que en ratas diabéticas por STZ, el tratamiento crónico de GW0742 mejora la relajación dependiente de endotelio, principalmente por prevención del componente mediado por NO. Este efecto

protector puede ser atribuible a una disminución en el nivel vascular de ET-1, reduciendo el estrés oxidativo por normalización de la expresión de determinadas subunidades de la NADPH oxidasa (Figura 28).

Nosotros creemos que nuestros resultados deberían estimular un interés adicional en los agonistas PPAR β como fármacos de potencialidad terapéutica en la enfermedad vascular asociada a diabetes.

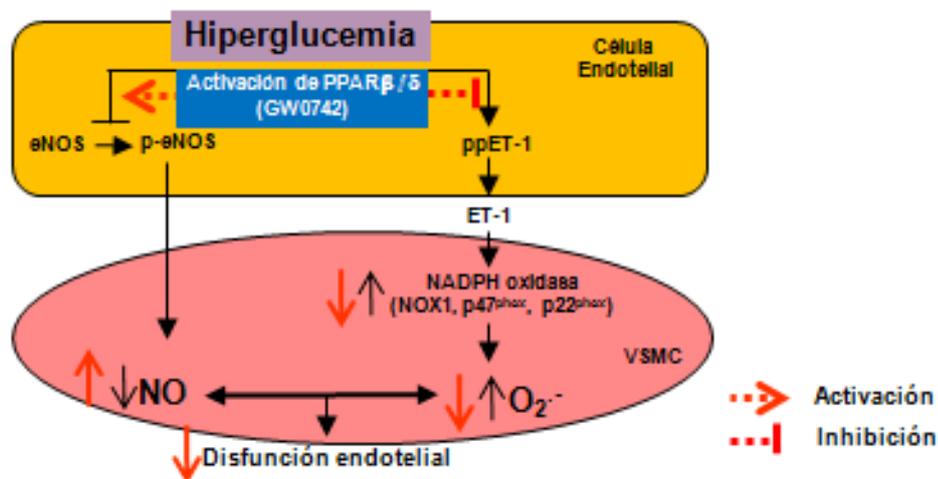


Figura 28. Mecanismo propuesto del efecto beneficioso sobre la disfunción endotelial del agonista PPAR β , GW0742 en aorta de ratas diabéticas tipo 1.

Conclusiones.

Conclusiones

1. La activación de PPAR- β mejora la ruta Akt-eNOS, llevando a un incremento en la producción de NO estimulado por insulina en HUVECs. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por activación de PDK4 que podría reducir el transporte de piruvato dentro de la mitocondria, normalizando la producción mitocondrial de ROS en la mitocondria y la actividad de la ERK1/2, con la subsiguiente mejora en la señalización de Akt-eNOS.

2. El tratamiento crónico de ratas con diabetes inducida por STZ con GW0742 mejora la relajación dependiente de endotelio, esencialmente por prevención del componente vasodilatador mediado por NO. Este efecto protector puede ser atribuible a una disminución en el nivel vascular de ET-1, lo que conlleva una reducción del estrés oxidativo por normalización de la expresión de la subunidad p22^{phox}, p47^{phox} y NOX-1 de la NADPH oxidasa.

Bibliografía.

Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem.* 1997;272:5128-32.

Agnetti G, Bordoni A, Angeloni C, Leoncini E, Guarnieri C, Caldarera CM, Biagi PL, Hrelia S. Green tea modulation of inducible nitric oxide synthase in hypoxic/reoxygenated cardiomyocytes. *Biochimie.* 2005;87:457-60.

Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM, Brewer HB Jr, Gonzalez FJ. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a western diet. *J Biol Chem.* 2004;279:20874-81.

Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol.* 1995;78:1969-76.

Alp NJ, Mussa S, Khoo J, et al. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I over-expression. *J Clin Invest.* 2003;112:725–735.

Al-Shafei, A.I.; Wise, R.G.; Gresham, G.A.; Bronns, G.; Carpenter, T.A.; Hall, L.D.; Huang, C.L. Non-invasive magnetic resonance imaging assessment of myocardial changes and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic rats. *J. Physiol.* 2002; 538:541-553.

Angulo, J., Rodriguez-Manas, L., Peiro, C., Neira, M., Marin, J. and Sanchez-Ferrer, C.F. Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized

autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358: 529–537.

Arsenijevic D, de Bilbao F, Plamondon J, Paradis E, Vallet P, Richard D, Langhans W, Giannakopoulos P. Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor beta-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:433-45.

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

Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:303-8.

Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10:238-45.

Barish GD, Atkins AR, Downes M, Olson P, Chong LW, Nelson M, Zou Y, Hwang H, Kang H, Curtiss L, Evans RM, Lee CH. PPARdelta regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:4271-6.

Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006;116:590-7.

- Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Cronin J, Leaming R, Steinberg HO. Effect of perfusion rate on the time course of insulin-mediated skeletal muscle glucose uptake. *Am J Physiol.* 1996;271: E1067–72.
- Baron AD. Insulin resistance and vascular function. *J Diabetes Complications.* 2002;16:92–102.
- Barroso E, Rodríguez-Calvo R, Serrano-Marco L, Astudillo AM, Balsinde J, Palomer X, Vázquez-Carrera M. The PPAR β/δ activator GW501516 prevents the down-regulation of AMPK caused by a high-fat diet in liver and amplifies the PGC-1 α -Lipin 1-PPAR α pathway leading to increased fatty acid oxidation. *Endocrinology.* 2011 May;152(5):1848-59.
- Bastie C, Luquet S, Holst D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. *J Biol Chem.* 2000;275:38768-73.
- Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002;287:2570–81.
- Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Creager MA. Inhibition of protein kinase C beta prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans. *Circ Res* 2002;90:107–111.
- Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Garrett LA, Keaney JF, Creager MA. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in type 1 but not type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2392–H2398.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424–C1437.

Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia*. 1996; 52: 344-347.

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

Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G, Biswas C, Cullinan CA, Hayes NS, Li Y, Tanen M, Ventre J, Wu MS, Berger GD, Mosley R, Marquis R, Santini C, Sahoo SP, Tolman RL, Smith RG, Moller DE. Novel peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem*. 1999;274:6718-25.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-435.

Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*. 1997;46:1481-90.

Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, et al. Diabetes associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 2001;50:2792-808.

Bishop-Bailey D, Hla T. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2. *J Biol Chem*. 1999;274:17042-8.

Bolaffi JL, Nagamatsu S, Harris J, Grodsky GM. Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation, of streptozotocin inhibition of insulin secretion. *Endocrinology*. 1987; 120: 2117-2122.

Bortolotto JW, Margis R, Ferreira AC, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM. Adipose tissue distribution and quantification of PPARbeta/delta and PPARgamma1-3 mRNAs: discordant gene expression in subcutaneous, retroperitoneal and visceral adipose tissue of morbidly obese patients. *Obes Surg*. 2007;17:934-40.

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

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:755-67.

Brunmair B, Staniek K, Dörig J, Szöcs Z, Stadlbauer K, Marian V, Gras F, Anderwald C, Nohl H, Waldhäusl W, Fürsinn C Activation of PPAR-delta in isolated rat skeletal muscle switches fuel preference from glucose to fatty acids. *Diabetologia*. 2006;49:2713-22.

Bucci M, Roviezzo F, Brancaleone V, et al. Diabetic mouse angiopathy is linked to progressive sympathetic receptor deletion coupled to an enhanced caveolin-1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(24):721-6.

Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkenin JD. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:4586-91.

Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, Kelly DP. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *J Clin Invest.* 2007;117:3930-9.

Caballero AE, Saouaf R, Lim SC, et al. The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Metabolism* 2003;52:173–180.

Calver, A., Collier, J. and Vallance, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2548 –2554.

Cameron, N.E. and Cotter, M.A. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia.* 1992; 35: 1011–1019.

Camici, G.G.; Schiavoni, M.; Francia, P.; Bachschmid, M.; Martin-Padura, I.; Hersberger, M.; Tanner, F.C.; Pelicci, P.; Volpe, M.; Anversa, P.; Lüscher, T.F.; Cosentino, F. Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104:5217-5222.

Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272:10811-6.

Campia U, Matuskey LA, Panza JA. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone improves endothelium-dependent dilation in

nondiabetic patients with major cardiovascular risk factors. *Circulation* 2006;113:867–875.

Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, et al. Expression of caveolin-1 in human adipose tissue is upregulated in obesity and obesity-associated type 2 diabetes mellitus and related to inflammation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68:213–9.

Chakravarthy, U., Hayes, RG., Stitt, E.McAuley AW., and Archer DB. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes*, vol. 47, no. 6, pp. 945–952, 1998.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59:527–605.

Cheetham C, Collis J, O'Driscoll G, Stanton K, Taylor R, Green D. Losartan, an angiotensin type 1 receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes [In Process Citation]. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1461–1466.

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

Chen K, Thomas SR, Albano A, Murphy MP, Keaney Jr JF. Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. *J Biol Chem*. 2004;279:35079–86.

Chen YH, Guh JY, Chuang TD, Chen HC, Chiou SJ, Huang JS, Yang YL, Chuang LY. High glucose decreases endothelial cell proliferation via the

extracellular signal regulated kinase/p15(INK4b) pathway. Arch Biochem Biophys. 2007 Sep 1;465(1):164-71.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. FEBS Lett. 1999 Jan 29;443(3):285-9.

Chen, Z.; Bakhshi, F.R.; Shajahan, A.N.; Sharma, T.; Mao, M.; Trane, A.; Bernatchez, P.; van Nieuw Amerongen, G.P.; Bonini, M.G.; Skidgel, R.A.; Malik, A.B.; Minshall, R.D. Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. Mol. Biol. Cell. 2012; 23:1388-1398.

Cheng L, Ding G, Qin Q, Huang Y, Lewis W, He N, Evans RM, Schneider MD, Brako FA, Xiao Y, Chen YE, Yang Q. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. Nat Med. 2004;10:1245-50b.

Cheng L, Ding G, Qin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE, Yang Q. Peroxisome proliferators-activated receptor delta activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;313:277-86a.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. Inflamm Res. 2000;49:497-505.

Chou CJ, Haluzik M, Gregory C, Dietz KR, Vinson C, Gavrilova O, Reitman ML. WY14,643, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)

agonist, improves hepatic and muscle steatosis and reverses insulin resistance in lipoatrophic A ZIP/F-1 mice. *J Biol Chem.* 2002;277:24484-9.

Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, McIntosh MK. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology.* 2006;147:5340-51.

Cimini A, Benedetti E, Cristiano L, Sebastiani P, D'Amico MA, D'Angelo B, Di Loreto S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and retinoic acid receptors (RXRs) in rat cortical neurons. *Neuroscience.* 2005;130:325-37.

Clarkson, P., Celermajer, D.S., Donald, A.E., Sampson, M., Sorensen, K.E., Adams, M., Yue, D.K., Betteridge D.J. and Deanfield, J.E. Impaired vascular reactivity in insulin- dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 28: 573–579.

Coll T, Alvarez-Guardia D, Barroso E, Gómez-Foix AM, Palomer X, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- δ by GW501516 prevents fatty acid-induced nuclear factor- κ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology.* 2010 Apr;151(4):1560-9.

Collino, M.; Benetti, E.; Miglio, G.; Castiglia, S.; Rosa, A.C.; Aragno, M.; Thiernemann, C.; Fantozzi, R. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonism protects the kidney against ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50:345-353.

Constantin D, Constantin-Teodosiu D, Layfield R, Tsintzas K, Bennett AJ, Greenhaff PL. PPARdelta agonism induces a change in fuel metabolism and activation of an atrophy programme, but does not impair mitochondrial function in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 2007;583:381-90.

Cosentino, F., Eto, M., de Paolis P. et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*, vol. 107, no. 7, pp. 1017–1023, 2003.

Costa E Forti, A. and Fonteles, M.C. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. *Horm. Metab. Res.* 1998; 30: 55–57.

Cotter MA, Jack AM, Cameron NE. Effects of the protein kinase C beta inhibitor LY333531 on neural and vascular function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2002;103:311–321.

Crijns, F.R., Struijker Boudier, H.A. and Wolffenbuttel, B.H. Arteriolar reactivity in conscious diabetic rats. Influence of aminoguanidine treatment. *Diabetes.* 1998; 47: 918–923.

Dai, F., Diederich, A., Skopec, J. and Diederich, D. Diabetes-induced endothelial dysfunction in streptozotocin- treated rats: role of prostaglandin endoperoxides and free radicals. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993; 4: 1327–1336.

Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2907–10.

Darley-USmar V. The powerhouse takes control of the cell; the role of mitochondria in signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:753–4.

Davda RK, Stepniakowski KT, Lu G, Ullian ME, Goodfriend TL, Egan BM. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension.* 1995;26:764–770.

Daynes RA and Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:748-59.

de Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, et al. Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 2006;29:1083–1089.

de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem.* 2004;279:17070–8.

de Lange P, Farina P, Moreno M, Ragni M, Lombardi A, Silvestri E, Burrone L, Lanni A, Goglia F. Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB J.* 2006;20:2579-81.

de Lange P, Ragni M, Silvestri E, Moreno M, Schiavo L, Lombardi A, Farina P, Feola A, Goglia F, Lanni A. Combined cDNA array/RT-PCR analysis of gene expression profile in rat gastrocnemius muscle: relation to its adaptive function in energy metabolism during fasting. *FASEB J.* 2004;18:350-2.

De Vriese, A., Van De Voorde, J., Vanholder, R. and Lameire, N. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated renal vasodilatory response in diabetes: restoration with folate. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 394A.

De Vriese, A.S. ; Verbeuren, T.J. ; Van de Voode, J.; Lameire, N.H.; Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 130:963-974.

Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O₆-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50: 2015-2020.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem.* 1999;274:32048-32054.

Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin- induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res.* 1999;85:394-402.

Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med.* 2001;193:827-38.

Desvergne B and W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr. Rev.* 1999; 20:649–688.

Devchand PR, Hiji AK, Perroud M, Schleuning WD, Spiegelman BM, Wahli W. Chemical probes that differentially modulate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and BLTR, nuclear and cell surface receptors for leukotriene B(4). *J Biol Chem.* 1999;274:23341-8.

Diederich, D., Skopec, J., Diederich, A. and Dai, F. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: H1153–H1161.

Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPAR α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension.* 2002;40:866-871.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601–5.

Ding G, Cheng L, Qin Q, Frontin S, Yang Q. PPAR α modulates lipopolysaccharide-induced TNF α inflammation signaling in cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40:821-828.

Ding, H., Aljofan, M., Triggle, C.R.. Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 2007; 212, 682–689.

Donato AJ, Black AD, Jablonski KL, Gano LB, Seals DR. Aging is associated with greater nuclear NF κ B, reduced IkappaB α , and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell.* 2008;7:805–12.

Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, et al. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* 2007;100:1659–66.

Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GEO. The peroxisome proliferators-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2477-93.

Du J, Guan T, Zhang H, Xia Y, Liu F, Zhang Y. Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Apr 4;368(2):402-7.

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001; 108:1341–1348.

Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G.,Goldberg,H., Ziyadeh, F.,Wu, J., Brownlee, M.. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000; 97, 12222–12226.

Duchen MR. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes.* 2004;53:S96–102.

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes.* 2003;52:1799–805.

Duncan ER, Crossey PA, Walker S, et al. Effect of endothelium-specific insulin resistance on endothelial function in vivo. *Diabetes*. 2008;57:3307–14.

Durante, W., Sen, A.K. and Sunahara, F.A. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 1988; 94: 463–468.

Duve D. The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1969;173:71-83.

Ehrenborg E, Krook A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Rev.* 2009;61:373-93.

Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia.* 2000; 43: 1528-1533.

Endemann DH and Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:1983-92.

Endo, K., Abiru, T., Machida, H., Kasuya, Y. and Kamata, K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor does not contribute to the decrease in endothelium-dependent relaxation in the aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen. Pharmacol.* 1995; 26: 149–153.

Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology.* 2001;142:4195-202.

Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 2002; 23, 599–622.

Fan Y, Wang Y, Tang Z, Zhang H, Qin X, Zhu Y, Guan Y, Wang X, Staels B, Chien S, Wang N. Suppression of pro-inflammatory adhesion molecules by PPAR-delta in human vascular endothelial cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:315-21.

Feêlêatou, M. and Vanhoutte, P.M. The alternative: EDHF. *J. Moll. Cell. Cardiol.* 1999; 31: 15–22.

Federici M, Pandolfi A, De Filippis EA, et al. G972R IRS-1 variant impairs insulin regulation of endothelial nitric oxide synthase in cultured human endothelial cells. *Circulation.* 2004;109:399–405.

Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006;45:120-59.

Festa A, D'Agostino Jr R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000;102:42–7.

Fleischman A, Shoelson SE, Bernier R, Goldfine AB. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care.* 2008;31:289–94.

Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4312-7.

Fortes, Z.B., Leme, J.G. and Scivoletto, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. *Br. J. Pharmacol*. 1983;79:771–781.

Fritz T, Krämer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, Krook A. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPAR δ and UCP3 in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006; 22:492–498.

Füllert S, Schneider F, Haak E, Rau H, Badenhoop K, Lübben G, Usadel KH, Konrad T. Effects of pioglitazone in nondiabetic patients with arterial hypertension: a double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:5503-5506.

Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M, Sakuma, I. and Kitabatake, A. Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol*. 1997; 121: 1383–1391.

Fulton, D., McGiff, J.C. and Quilley, J. Cytochrome P450 arachidonate metabolites: deficit in diabetes mellitus? *FASEB J*. 1996; 9: A113.

Ganda OP, Rossi AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*. 1976; 25: 595-60.

Gao L, Mann GE. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res*. 2009;82:9–20.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*. 1998;392:821–4.

Gaudel C, Schwartz C, Giordano C, Abumrad NA, Grimaldi PA. Pharmacological activation of PPARbeta promotes rapid and calcineurin-dependent fiber remodeling and angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295:E297-304.

Gazis, A., White, D.J., Page, S.R. and Cockcroft, J.R. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med*. 1999; 16: 304–311.

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

Giordano C, Rousseau AS, Wagner N, Gaudel C, Murdaca J, Jehl-Piétri C, Sibille B, Grimaldi PA, Lopez P. Peroxisome proliferator-activated receptor beta activation promotes myonuclear accretion in skeletal muscle of adult and aged mice. *Pflugers Arch*. 2009;458:901-13.

Gokce N, Vita JA, Donnell M, et al. Effect of medical and surgical weight loss on endothelial vasomotor function in obese patients. *Am J Cardiol* 2005;95:266–268.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114:597–605.

Gómez-Guzmán, M.; Jiménez, R.; Sánchez, M.; Romero, M.; O'Valle, F.; Lopez-Sepulveda, R.; Quintela, A.M.; Galindo, P.; Zarzuelo, M.J.; Bailón, E.; Delpón, E.; Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Chronic (-)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide-deficient rats. *Br. J. Nutr.* 2011; 106:1337-1348.

Graham, T.L.; Mookherjee, C.; Suckling, K.E.; Palmer, C.N.; Patel, L. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Atherosclerosis.* 2005; 181:29-37.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305:626–9.

Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping, *Gene Expr.* 1995;4:281-299.

Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:11012-6.

Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, DuBois RN. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated-receptor delta in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13275-80.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;105:1656–1662.

Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:580-91.

Hamburg, NM.; Vita, JA. Endothelial dysfunction in atherosclerosis: Mechanisms of impaired nitric oxide bioactivity. *Molecular mechanisms of atherosclerosis.* 2006; 95-110.

Hamdy O, Ledbury S, Mullooly C, et al. Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 2003;26:2119–2125.

Han JK, Lee HS, Yang HM, Hur J, Jun SI, Kim JY, Cho CH, Koh GY, Peters JM, Park KW, Cho HJ, Lee HY, Kang HJ, Oh BH, Park YB, Kim HS. Peroxisome proliferator activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Circulation.* 2008;118:1021-1033.

Han S, Ritzenthaler JD, Wingerd B, Roman J. Activation of peroxisome proliferator activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) increases the expression of prostaglandin E2 receptor subtype EP4. The roles of phosphatidylinositol 3-kinase and CCAAT/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem.* 2005;280:33240-3329.

Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ and Peters JM: Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med.* 2004;10:481-483.

Harrington, L.S.; Moreno, L.; Reed, A.; Wort, S.J.; Desvergne, B.; Garland, C.; Zhao, L.; Mitchell, J.A. The PPARbeta/delta agonist GW0742 relaxes pulmonary

vessels and limits right heart hypertrophy in rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2010; 5:e9526.

Hartell NA, Archer HE, Bailey CJ. Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem Pharmacol*. 2005;69:781–90.

Hattori, Y., Kawasaki, H., Abe, K. and Kanno, M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am. J. Physiol*. 1991; 261: H1086–H1094.

He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003;100:15712-7.

Heineke J, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:589-600.

Heitzer T, Krohn K, Albers S, Meinertz T. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2000;43:1435–1438.

Henriksen EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R974–R980.

Hetzel J, Balletshofer B, Rittig K, et al. Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1804–1809.

Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM, Olefsky J. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med.* 2003;9:1491-7.

Heygate, K.M., Lawrence, I.G., Bennett, M.A. and Thurston, H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 116: 3251–3259.

Hink, U.; Li, H.; Mollnau, H.; Oelze, M.; Matheis, E.; Hartmann, M.; Skatchkov, M.; Thaiss, F.; Stahl, R.A.; Warnholtz, A.; Meinertz, T.; Griendling, K.; Harrison, D.G.; Forstermann, U.; Munzel, T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.* 2001; 88:E14-E22.

Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41:2502-2512.

Holness MJ, Kraus A, Harris RA, Sugden MC. Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes.* 2000;49:775-81.

Holst D, Luquet S, Kristiansen K, Grimaldi PA. Roles of peroxisome proliferator-activated receptors delta and gamma in myoblast transdifferentiation. *Exp Cell Res.* 2003;288:168-76.

Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, Grimaldi PA. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor delta in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1633:43-50.

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

Houmard JA. Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R1111-6.

Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Paradis P, Amiri F, Diep QN, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension*. 2003;42:737-43.

Imai H, Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Yokouchi K, Ogawa Y, Kondo T, Okumura K, Murohara T. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation by suppressing PPAR delta expression. *Atherosclerosis*. 2007;195:322-32.

Ishii H, Jirousek MR, Koya D, et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996;272:728-731.

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

Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 2002;51:2005-2011.

Iwashita A, Muramatsu Y, Yamazaki T, Muramoto M, Kita Y, Yamazaki S, Mihara K, Moriguchi A, Matsuoka N. Neuroprotective efficacy of the peroxisome

proliferator-activated receptor delta-selective agonists in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;320:1087-96.

Jackson L, Wahli W, Michalik L, Watson SA, Morris T, Anderton K, Bell DR, Smith JA, Hawkey CJ, Bennett AJ. Potential role for peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) in preventing colon cancer. *Gut.* 2003;52:1317-22.

Jay, D.; Hitomi, H.; Griedling, K.K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 40:183-192.

Jiang B, Liang P, Zhang B, Song J, Huang X, Xiao X. Role of PPAR-beta in hydrogen peroxide-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2009;204:353-8.

Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, et al. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest.* 1999;104:447-57.

Jiménez, R.; López-Sepúlveda, R.; Kadmiri, M.; Romero, M.; Vera, R.; Sánchez, M.; Vargas, F.; O'Valle, F.; Zarzuelo, A.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C.; Duarte, J. Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43:462-473.

Johnson TE, Holloway MK, Vogel R, Rutledge SJ, Perkins JJ, Rodan GA, Schmidt A. Structural requirements and cell-type specificity for ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;63:1-8.

Jucker BM, Yang D, Casey WM, Olzinski AR, Williams C, Lenhard SC, Legos JJ, Hawk CT, Sarkar SK, Newsholme SJ. Selective PPARdelta agonist treatment

increases skeletal muscle lipid metabolism without altering mitochondrial energy coupling: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:E1256-64.

Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG, Meier CA. Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem.* 1999;274:10505-10.

Kamata, K.; Kobayashi, T. Changes in superoxide dismutase mRNA expression by streptozotocin-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119:583-589.

Kamata, K.; Miyata, N.; Kasuya, Y. Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 1989; 97:614-618.

Kamata, K.; Yamashita, K. Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilatation in fructose-fed hypertensive rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1999; 103:195-210.

Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 1996;85:403-14.

Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee CH. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008;7:485-95.

Kanie, N.; Kamata, K. Effects of chronic administration of the novel endothelin antagonist J-101432 on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135:1935-1942.

Kanie, N.; Matsumoto, T.; Kobayashi, T.; Kamata K. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR alpha and PPAR gamma) and endothelium-dependent relaxation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 2003; 140:23-32.

Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:434–439.

Keaney JF Jr, Massaro JM, Larson MG, et al. Heritability and correlates of intercellular adhesion molecule-1 in the Framingham Offspring Study. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:168–173.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:2160-4.

Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51:2944–50.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999;103:1489-98.

Khan O, Riazi S, Hu X, Song J, Wade JB, Ecelbarger CA. Regulation of the renal thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, blood pressure, and natriuresis in obese Zucker rats treated with rosiglitazone. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:F442-50.

Kiens B. Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2006;86:205-43.

Kiff, R.J., Gardiner, S.M., Compton, A.M. and Bennett, T. Selective impairment of hindquarters vasodilator responses to bradykinin in conscious wistar rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 103: 1357–1362.

Kim F, Gallis B, Corson MA. TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C1057–65.

Kim F, Pham M, Maloney E, et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1982–8.

Kim F, Tysseling KA, Rice J, et al. Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKK β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:989–94.

Kim HJ, Ham SA, Kim SU, Hwang JY, Kim JH, Chang KC, Yabe-Nishimura C, Kim JH, Seo HG. Transforming growth factor-beta1 is a molecular target for the peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Circ Res.* 2008;102:193-200.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113:1888–904.

Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008;102:401–14.

Kino T, Rice KC, Chrousos GP. The PPAR α agonist GW501516 suppresses interleukin-6-mediated hepatocyte acute phase reaction via STAT3 inhibition. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:425-433.

Kleiner S, Nguyen-Tran V, Baré O, Huang X, Spiegelman B, Wu Z. PPAR δ agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1 α but does not increase mitochondrial gene expression and function. *J Biol Chem*. 2009;284:18624-33.

Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*. 1992;355:446-9.

Kobayashi, T.; Kamata, K. Relationship among cholesterol, superoxide anion and endothelium-dependent relaxation in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol*. 1999; 367:213-222.

Kobayashi, T.; Matsumoto, T.; Kamata, K. Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent aortic relaxation seen in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol*. 2000; 131:231-238.

Koltai, M.Z., Hadhazy, P., Posa, I., Kocsis, E., Winkler, G., Roèsen, P. and Pogatsa, G. Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc. Res.* 1997; 34: 157–163.

Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005;51:85-94.

Kouroedov A, Eto M, Joch H, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Selective inhibition of protein kinase C β 2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 2004;110:91–96.

Kouroedov, M. Eto, H. Joch, M. Volpe, T. F. L'uscher, and F. Cosentino. Selective inhibition of protein kinase C β 2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*, vol. 110, no. 1, pp. 91–96, 2004.

Kowluru, R.A., Atasi, L., Ho, Y.-S. Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47, 1594–1599.

Krämer DK, Al-Khalili L, Guigas B, Leng Y, Garcia-Roves PM, Krook A. Role of AMP kinase and PPAR δ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2007;282:19313-20.

Krämer DK, Al-Khalili L, Perrini S, Skogsberg J, Wretenberg P, Kannisto K, Wallberg-Henriksson H, Ehrenborg E, Zierath JR, Krook A. Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ . *Diabetes.* 2005; 54:1157–1163

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol.* 1997;11:779-91.

Kröncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide generation during cellular metabolization of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 1995;376: 179-185.

Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004;62:505–15.

Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation.* 2000;101:676–81.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999;4:597-609.

Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells

reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* 2011 Mar 2;13(3):294-307.

Lam TY, Seto SW, Lau YM, et al. Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic+db/+db mice. *Eur J Pharmacol.* 2006;546:134–41.

Lash, J.M. and Bohlen, H.G. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat arterioles. *Circ. Res.* 1991; 69: 1259–1268.

Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARdelta. *Science.* 2003;302:453-7.

Lee CH, Olson P and Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors, *Endocrinology.* 2003; 144:2201–2207.

Lee KS, Park JH, Lee S, Lim HJ, Jang Y, Park HY. Troglitazone inhibits endothelial cell proliferation through suppression of casein kinase 2 activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346:83-88.

Lee KS, Park SJ, Kim SR, Min KH, Jin SM, Lee HK, Lee YC. Modulation of airway remodeling and airway inflammation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Immunol.* 2006;177:5248-57.

Lei H, Venkatakrisnan A, Yu S, Kazlauskas A. Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes. *J Biol Chem.* 2007;282:9364–71.

Leibovitz E, Schiffrin EL. PPAR activation: a new target for the treatment of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50:120-125.

Leibowitz MD, Fiévet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J. Activation of PPAR δ alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett.* 2000; 473:333–336

Lekakis, J., Papamichael, C., Anastasiou, H., Alevizaki, M., Desses, N., Souvatzoglou, A., Stamatelopoulos, S. and Koutras, D.A. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc. Res.* 1997; 34: 164–168.

Lenzen S. Alloxan and streptozotocin diabetes. *Zeitstrukturen endokriner Systeme. Abhandlung der Sächs. Akad. Wiss., Mathnaturwiss Klasse, Verlag der Sächsischen Akademie der Wissenschaften, Leipzig, commissioned by S. Hirzel Verlag, Stuttgart/ Leipzig, 2007; 119–138.*

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes *Diabetologia* 2008; 51:216–226.

Leo, C.H.; Hart, J.L.; Woodman, O.L. Impairment of both nitric oxide-mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 2011; 162:365-377.

Letavernier E, Perez J, Joye E, Bellocq A, Fouqueray B, Haymann JP, Heudes D, Wahli W, Desvergne B, Baud L. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta exerts a strong protection from ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2395-402.

- Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW, Valledor AF, Davis RA, Willson TM, Witztum JL, Palinski W, Glass CK. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPAR α , β / δ , and γ . *J Clin Invest*. 2004;114:1564-76.
- Li B, Nolte LA, Ju JS, et al. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nat Med*. 2000;6:1115–20.
- Li L, Chu Y, Fink GD, Engelhardt JF, Heistad DD, Chen AF. Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003c;42:997-1003.
- Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation*. 2003a;107:1053-1058.
- Li L, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. Vasopressin induces vascular superoxide via endothelin-1 in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003ab;41:663-8.
- Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension*. 2003b;42:316-21.
- Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4699-707.
- Liang YJ, Liu YC, Chen CY, Lai LP, Shyu KG, Juang SJ, Wang BW, Leu JG. Comparison of PPAR δ and PPAR γ in inhibiting the pro-inflammatory effects of C-reactive protein in endothelial cells. *Int J Cardiol*. 2010;143:361-7.

Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev.* 1999;13:1561-74.

Lim HJ, Lee S, Park JH, Lee KS, Choi HE, Chung KS, Lee HH, Park HY. PPAR delta agonist L-165041 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle. *Atherosclerosis.* 2009;202:446-454.

Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK. Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1481-1487.

Liu, S.; Ma, X.; Gong, M.; Shi, L.; Lincoln, T.; Wang, S. Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 42:852-863.

Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE Study and MICRO-HOPE Substudy. *Diabetes Care.* 2002;25:1919–1927.

Lopez-Lopez, J.G. Moral-Sanz, J.; Frazziano, G.; Gomez-Villalobos, M.J.; Flores-Hernandez, J.; Monjaraz, E.; Cogolludo, A.; Perez-Vizcaino, F. Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008; 295:L727-L732.

Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science.* 2005;307:384–7.

Lv ZM, Liu Y, Zhang PJ, Xu J, Jia ZH, Wang R, Wan Q. The Role of AMPK α in High-Glucose-Induced Dysfunction of Cultured Rat Mesangial Cells. *Ren Fail.* 2012;34(5):616-21.

Macallister, R.J., Calver, A.L., Collier, J., Edwards, M.B., Herreros, B., Nussey, S.S. and VALLANCE, P. Vascular and hormonal responses to arginine: provision of substrate for nitric oxide or non-specific effect. *Clin. Sci.* 1995; 89: 183–190.

Majithiya, J.B.; Paramar, A.N.; Balaraman, R. Pioglitazone, a PPAR γ agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc. Res.* 2005; 66:150-161.

Makino, A.; Kamata, K. Elevated plasma endothelin-1 level in streptozotocin-induced diabetic rats and responsiveness of the mesenteric arterial bed to endothelin-1. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123:1065-1072.

Makino, A.; Kamata, K. Time-course changes in plasma endothelin-1 and its effects on the mesenteric arterial bed in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Obes. Metab.* 2000; 2:47-55.

Makino, A.; Ohuchi, K.; Kamata, K. Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* 2000; 130:549-556.

Maloney E, Sweet IR, Hockenbery DM, et al. Activation of NF-kappaB by palmitate in endothelial cells: a key role for NADPH oxidase-derived superoxide in response to TLR4 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1370–1375.

Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83:841-50.

Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*. 2004;94:1168-1178.

Mather K, Laakso M, Edelman S, Hook G, Baron A. Evidence for physiological coupling of insulin-mediated glucose metabolism and limb blood flow. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279:E1264-70.

Mather KJ, Verma S, Anderson TJ. Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1344-1350.

Matsumoto, T.; Noguchi, E.; Kobayashi, T.; Kamata, K. Mechanisms underlying the chronic pioglitazone treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent relaxation seen in aortas from diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med*. 2007; 42:993-1007.

Matsunaga, T., Okumura, K., Ishizaka, H., Tsunoda, R., Tayama, S., Tabuchi, T. and YASUE, H. Impairment of coronary blood flow regulation by endothelium-derived nitric oxide in dogs with alloxan-induced diabetes. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1996; 28: 60-67.

Matsushita, Y.; Ogawa, D.; Wada, J.; Yamamoto, N.; Shikata, K.; Sato, C.; Tachibana, H.; Toyota, N.; Makino, H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice. *Diabetes*. 2011; 60:960-968.

Matsuura H, Adachi H, Smart RC, Xu X, Arata J, Jetten AM. Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;147:85-92.

Mayhan, W.G. and Faraci, F.M. Responses of cerebral arterioles in diabetic rats to activation of ATP-sensitive potassium channels. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: H152–H157.

Mayhan, W.G. and Patel, K.P. Acute effects of glucose on reactivity of cerebral microcirculation: role of activation of protein kinase C. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: H1297 –H1302.

Mayhan, W.G. and Patel, K.P. Treatment with dimethylthiourea prevents impaired dilation of the basilar artery during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: H1895 –H1901.

Mayhan, W.G. Superoxide dismutase partially restores impaired dilatation of the basilar artery during diabetes mellitus. *Brain. Res.* 1997; 760: 204–209.

Mayhan, W.G., Patel, K.P. and Sharpe, G.M. Effect of L- arginine on reactivity of hamster cheek pouch arterioles during diabetes mellitus. *Int. J. Microcirc.* 1997; 17: 107–112.

Mayhan, W.G., Simmons, L.K. and Sharpe, G.M. Mechanisms of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 1991; 260: H319–H326.

McVeigh, G.E., Brennan, G.M., Johnston, G.D., McDermott, B.J., McGrath, L.T., Henry, W.R., Andrews, J.W. and Hayes, J.R. Dietary fish oil augments nitric

oxide production or release in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1993; 36: 33–38.

Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2004;291:1978–1986.

Meigs JB, Larson MG, Fox CS, Keaney JF Jr, Vasan RS, Benjamin EJ. Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2007;30:2529–2535.

Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, et al. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA* 2000;283:221–228.

Menzies RA, Gold PH. The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J Biol Chem*. 1971;246:2425–2429.

Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, Peters JM, Kaya G, Gonzalez FJ, Zakany J, Metzger D, Chambon P, Duboule D, Wahli W. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β mutant mice. *J Cell Biol*. 2001;154:799-814.

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*. 1997;272:15583–6.

Miyazaki Y., Mahankali A., Matsuda M., Mahankali S., Hardies J., Cusi K., Mandarino L.J. and DeFronzo R.A. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002; 87:2784–2791.

Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:212-7.

Mombouli, J.V. and Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol. Sci.* 1997; 18: 252–256.

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem.* 2001;276:30392–8.

Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277:1794–9.

Montessuit C, Papageorgiou I, Lerch R. Nuclear receptor agonists improve insulin responsiveness in cultured cardiomyocytes through enhanced signaling and preserved cytoskeletal architecture. *Endocrinology.* 2008;149:1064-74.

Montezano, A.C.; Amiri, F.; Tostes, R.C.; Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Inhibitory effects of PPAR-gamma on endothelin-1-induced inflammatory pathways in vascular smooth muscle cells from normotensive and hypertensive rats. *J. Am. Soc. Hypertens.* 2007; 1:150-160.

Monti LD, Barlassina C, Citterio L, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2003;52:1270–1275.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1alpha responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.*

Moraes LA, Swales KE, Wray JA, Damazo A, Gibbins JM, Warner TD, Bishop-Bailey D. Nongenomic signaling of the retinoid X receptor through binding and inhibiting Gq in human platelets. *Blood*. 2007;109:3741-4.

Morgan NG, Cable HC, Newcombe NR, Williams GT. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep*. 1994; 14: 243-250.

Morino K, Petersen KF, Dufour S, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. 2005;115:3587-93.

Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003 Aug 22;278(34):31629-39.

MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:23-33.

Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*. 1998;1:465-70.

Münzel T, Keaney JF Jr. Are ACE-inhibitors a “magic bullet” against oxidative stress? *Circulation*. 2001;104:1571-1574.

Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*. 2007;28:463-91.

Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMPdependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1551–1557.

Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL, Kraus WE. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem.* 2002;277:26089-97.

Murakami H, Murakami R, Kambe F, Cao X, Takahashi R, Asai T, Hirai T, Numaguchi Y, Okumura K, Seo H, Murohara T. Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 24;341(4):973-8.

Nacci C, Tarquinio M, Montagnani M. Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes. *Intern Emerg Med.* 2009;4:107–16.

Nangle MR, Cotter, MA and Cameron, NE. Protein kinase C β inhibition and aorta and corpus cavernosum function in streptozotocin-diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, vol. 475, no. 1–3, pp. 99–106, 2003.

Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, et al. Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 2006;55:691–698.

Nishikawa, T., Kukidome, D., Sonoda, K., Fujlisawa, K., Matsuhisa, T., Motoshima, H., Matsumura, T., Araki, E. Impact of mitochondrial ROS

production on diabetic vascular complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2007; 77S, S41–S45.

Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ Res.* 2007;100:795–806.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science.* 2003;299:896–9.

Nisoli E, Falcone S, Tonello C, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:16507–12.

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 2005;310:314–7.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature.* 1998;395:137-43.

Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.* 1990b; 127: 161-165.

Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, Naruse K, Yamada M, Osanai H, Matsui H, Ito M, Murohara T. Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries. *Cardiovasc Res.* 2004;61:177-85.

O'Driscoll G, Green D, Maiorana A, Stanton K, Colreavy F, Taylor R. Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1506–1511.

Oak JH, Cai H. Attenuation of angiotensin II signaling recouples eNOS and inhibits nonendothelial NOX activity in diabetic mice. *Diabetes*. 2007;56:118–126.

Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, Subramanian V, Mukundan L, Ferrante AW, Chawla A. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2008;7:496-507.

Okon EB, ChungAW, Rauniyar P, et al. Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2005;54:2415–23.

Oliver Jr WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Klierer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:5306–5311.

Olukman, M.; Sezer, E.D.; Ulker, S.; Sözmen, E.Y.; Cınar, G.M. Fenofibrate treatment enhances antioxidant status and attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp. Diabetes Res*. 2010 ; 2010:828531.

Oyama, Y., Kawasaki, H., Hattori, Y. and Kanno, M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol*. 1986; 131: 75–78.

Palmeira, C.M., Rolo, A.P., Berthlaume, J., Bjork, J.A., Wallace, K.B. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: The regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 225, 214–220.

Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation.* 2000;101:235-8.

Patel MS, Korotchkina LG. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr;34(Pt 2):217-22.

Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, et al. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:8466–71.

Pellieux C, Montessuit C, Papageorgiou I, Lerch R. Inactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms alpha, beta/delta, and gamma mediate distinct facets of hypertrophic transformation of adult cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* 2007;455:443-54.

Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi PA, Rochette L, Connat JL. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2006;69:440-9.

Peters JM, Gonzalez FJ. Sorting out the functional role(s) of peroxisome proliferator activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) in cell proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1796:230-41.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . *Mol Cell Biol.* 2000;20:5119-28.

Petersen KF, Befroy D, Dufour S, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* 2003;300:1140–2.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2004;350:664–71.

Pialat JB, Cho TH, Beuf O, Joye E, Moucharrafi S, Langlois JB, Nemoz C, Janier M, Berthezene Y, Nighoghossian N, Desvergne B, Wiart M. MRI monitoring of focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-deficient mice. *NMR Biomed.* 2007;20:335-42.

Piatti PM, Monti LD, Conti M, et al. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes.* 1996;45:316–21.

Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. Poly (ADPribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20:171–181.

Pieper GM. Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;29:8–15.

Pieper, G.M. and Peltier, B.A. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 25: 397–403.

Pieper, G.M., Mei, D.A., Langenstroer, P. and O'Rourke, S.T. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: H676–H680.

Pierce GL, Lesniewski LA, Lawson BR, Beske SD, Seals DR. Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation.* 2009;119:1284–92.

Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003;546:851–8.

Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, Tanabe T, Warner TD, Bishop-Bailey D. Activation of PPAR β /delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:63-9.

Piqueras L, Sanz MJ, Perretti M, Morcillo E, Norling L, Mitchell JA, Li Y, Bishop-Bailey D. Activation of PPAR β / δ inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. *J Leukoc Biol.* 2009;86:115-122.

Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes Care* 2004;27:484–490.

Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Atorvastatin improves peroxisome proliferator-activated receptor signaling in cardiac hypertrophy by preventing nuclear factor- κ B activation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1687:76-83b.

Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2005;280:17464-71a.

Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptoralpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signalling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998;273:32833-32841.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Creactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286:327-34.

Qian, L.B.; Wang, H.P.; Chen, Y.; Chen, F.X.; Ma, Y.Y.; Bruce, I.C.; Xia, Q. Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress. *Pharmacol. Res.* 2010; 61:281-287.

Quilley, J., McGiff, J.C., Mieyal, P., Rapacon, M. and Fulton, D. NO-independent coronary vasodilation to bradykinin in diabetes. *Hypertension.* 1996; 28: P178.

Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:5379-84.

Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011 Mar 1;50(5):567-75.

Rajagopalan S, Harrison DG. Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors: a new trend? *Circulation.* 1996;94:240-243.

Raji A, Seely EW, Bekins SA, Williams GH, Simonson DC. Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lowers blood pressure in hypertensive patients. *Diabetes Care*. 2003;26:172-178.

Ramachandran A, Levonen AL, Brookes PS, et al. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1465–74.

Rask-Madsen C, King GL. Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:487–496.

Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of disease. Endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab*. 2007; 3: 46–56.

Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med*. 1994;179:503–12.

Reyland, ME. Protein kinase C isoforms: multi-functional regulators of cell life and death. *Frontiers in Bioscience*, vol. 14, no. 6, pp. 2386–2399, 2009.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998;391:79-82.

Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54:8–14.

Rival Y, Benéteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Junquéro D, Colpaert FC, Delhon A. PPAR α and PPAR δ activators inhibit cytokine induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2002;435:143-151.

Rivier M, Safonova I, Lebrun P, Griffiths CE, Ailhaud G, Michel S. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998;111:1116-21.

Rizzuto R, Pozzan T, Carafoli E. Ca²⁺ on the move: ways and means to translate a multifarious signal. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:348–50.

Robinson E, Grieve DJ. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. *Pharmacol Ther.* 2009;122:246-63.

Rodríguez-Calvo R, Serrano L, Coll T, Moullan N, Sánchez RM, Merlos M, Palomer X, Laguna JC, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in adipocytes by lowering nuclear factor-kappaB activity via extracellular signal related kinase 1/2. *Diabetes.* 2008;57:2149-2157.

Roèsen, P., Ballhausen, T. and Stockklauser, K. Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications. *Diabetes Res. Clin. Pr.* 1996; 31: S143 –S155.

Rolo, A.P., Palmeira, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; 212, 167–178.

Romero, M.; Jiménez, R.; Sánchez, M.; López-Sepúlveda, R.; Zarzuelo, A.; Tamargo, J.; Pérez-Vizcaíno, F.; Duarte, J. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation. *Atherosclerosis*. 2010; 212:78-85.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999;4:611-7.

Rossi R, Cioni E, Nuzzo A, Origliani G, Modena MG. Endothelial-dependent vasodilation and incidence of type 2 diabetes in a population of healthy postmenopausal women. *Diabetes Care* 2005;28:702–707.

Roy RR, Monke SR, Allen DL, Edgerton VR. Modulation of myonuclear number in functionally overloaded and exercised rat plantaris fibers. *J Appl Physiol*. 1999;87:634-42.

Russell AP, Hesselink MK, Lo SK, Schrauwen P. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J*. 2005;19:986-8.

Saltiel A.R. and Kahn C.R., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*. 2001; 414:799–806.

Sandler S, Swenne I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia*. 1983; 25:444–447.

Schein PS, Loftus S. Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res*. 1968; 28:1501–1506.

Schiffrin EL and Touyz RM. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: Benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:911-3.

Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension.* 2003;42:664-8.

Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1037-H1043.

Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol.* 2005;43:19-29.

Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet.* 1999;353:1649–52.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 1996;37:907-25.

Serrano-Marco L, Rodríguez-Calvo R, El Kochairi I, Palomer X, Michalik L, Wahli W, Vázquez-Carrera M. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- β / $-\delta$ (PPAR- β / $-\delta$) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes.* 2011 Jul;60(7):1990-9.

Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology.* 1996;137:4499-502.

Shan W, Nicol CJ, Ito S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ protects against chemically induced liver toxicity in mice. *Hepatology*. 2008;47:225-235.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 1996;271:6518–22.

Shaw N, Elholm M, Noy N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*. 2003;278:41589-92.

Shearer BG, Steger DJ, Way JM, Stanley TB, Lobe DC, Grillot DA, Iannone MA, Lazar MA, Willson TM, Billin AN. Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol*. 2008;22:523-9.

Sheng L, Ye P, Liu YX, Han CG, Zhang ZY. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta activation improves angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Clin Exp Hypertens*. 2008;30:109-19.

Sher T, Yi H.F., McBride, O.W. and Gonzalez, F.J. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor, *Biochemistry*. 1993;32:5598-5604.

Shi, Y.; Ku, D.D.; Man, R.Y.; Vanhoutte, P.M. Augmented endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxations attenuate endothelial dysfunction in femoral and mesenteric, but not in carotid arteries from type I diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2006; 318:276-281.

Shimizu, K., Muramatsu, M., Kakegawa, Y., Asano, H., Toki, Y., Miyazaki, Y., Okumura, K., Hashimoto, H. and Ito, T. Role of prostaglandin H₂ as an endothelial-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes*. 1993; 42: 1246–1252.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793–801.

Smeets PJ, Teunissen BE, Willemsen PH, van Nieuwenhoven FA, Brouns AE, Janssen BJ, Cleutjens JP, Staels B, van der Vusse GJ, van Bilsen M. Cardiac hypertrophy is enhanced in PPAR alpha^{-/-} mice in response to chronic pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2008;78:79-89.

Sobrevia, L. and Mann, G.E. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp. Physiol*. 1997; 82: 423–452.

Sonta, T.; Inoguchi, T.; Tsubouchi, H.; Sekiguchi, N.; Kobayashi, K.; Matsumoto, S.; Utsumi, H.; Nawata, H. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic. Biol. Med*. 2004; 37:115-123.

Spitaler, M.M.; Graier, W.F. Vascular targets of redox signaling in diabetes mellitus. *Diabetologia* . 2002; 45:476-494.

Stael B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*. 1998;393:790-793.

Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest.* 1994;94:1172–9.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction: implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1996;97:2601–10.

Stocker R, Keaney JF Jr. The role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381–1478.

Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jan 23;378(4):836–41.

Szkudelski T, Kandulska K, Okulicz M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol Res.* 1998; 47: 343–346.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50:537–546.

Sznaidman, M.L.; Haffner, C.D.; Maloney, P.R.; Fivush, A.; Chao, E.; Goreham, D.; Sierra, M.L.; LeGrumelec, C.; Xu, H.E.; Montana, V.G.; Lambert, M.H.; Willson, T.M.; Oliver, W.R. Jr, Sternbach, D.D. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13:1517–1521.

T. Inoguchi, P. Li, F. Umeda et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49: 1939–1945.

T. Inoguchi, R. Battan, E. Handler, J. R. Sportsman, W. Heath, and G. L. King. Preferential elevation of protein kinase C isoform β II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89: 11059–11063.

Taguchi A. and White M.F., Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span, *Annu. Rev. Physiol.* 2008; 70:191–212.

Takada I, Yu RT, Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Kliewer SA, Evans RM, Umesono K. Alteration of a single amino acid in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR alpha) generates a PPAR delta phenotype. *Mol. Endocrinol.* 2000;14:733-740.

Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes*. 1991b; 40: 1141-1145.

Takata Y, Liu J, Yin F, Collins AR, Lyon CJ, Lee CH, Atkins AR, Downes M, Barish GD, Evans RM, Hsueh WA, Tangirala RK. PPARdelta-mediated antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:4277-4282.

Takenouchi, Y.; Kobayashi, T.; Taguchi, K.; Matsumoto, T.; Kamata, K. Relationship among superoxide-related enzyme, PPARs, and endothelium-

dependent relaxation in murine aortas previously organ-cultured in high-glucose conditions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2010; 88:760-769.

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor δ induces fatty acid β -oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:15924–15929.

Taylor, P.D., Graves, J.E. and Poston, L. Selective impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of streptozotocin- induced diabetic rat. *Clin. Sci.* 1995; 88: 519–524.

Taylor, P.D., McCarthy, A.L., Thomas, C.R. and Poston, L. Endothelium-dependent relaxation and noradrenaline sensitivity in mesenteric resistance arteries of streptozotocin- induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107: 393–399.

Taylor, P.D., Wickenden, A.D., Mirrlees, D.J. and Poston, L. Endothelial function in the isolated perfused mesentery and aortae of rats with streptozotocin-induced diabetes: effect of treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat. *Br. J. Pharmacol.* 1994b; 111: 42–48.

Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol.* 1992;263:H321–H326.

Tesfamariam, B., Brown, M.L., Deykin, D. and Cohen, R.A. Elevated glucose promotes generation of endothelium- derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 929–932.

Thors B, Halldórsson H, Jónsdóttir G, Thorgeirsson G. Mechanism of thrombin mediated eNOS phosphorylation in endothelial cells is dependent on ATP levels after stimulation. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Oct;1783(10):1893-902.

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endotheliumdependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1996;97:22–28.

Tomasian D, Keaney JF Jr, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 2000;47:426–435.

Tone, A.; Shikata, K.; Sasaki, M.; Ohga, S.; Yozai, K.; Nishishita, S.; Usui, H.; Nagase, R.; Ogawa, D.; Okada, S.; Shikata, Y.; Wada, J.; Makino, H. Erythromycin ameliorates renal injury via anti-inflammatory effects in experimental diabetic rats. *Diabetologia*. 2005; 48:2402-2411.

Tonelli J., Li W., Kishore P., Pajvani U.B., Kwon E., Weaver C., Scherer P.E. and Hawkins M. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes, *Diabetes*. 2004; 53:1621–1629.

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 1994;8:1224-34.

Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol*. 200;12:245-54.

Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker P. PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine

model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol.* 2003;139:163-71.

Tschudi, M.R.; Mesaros, S.; Lüscher, T.F.; Malinski, T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension.* 1996; 27:32-35.

Tsintzas K, Jewell K, Kamran M, Laithwaite D, Boonsong T, Little wood J, Macdonald I, Bennett A. Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans. *J Physiol.* 2006;575:291-303.

Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 197:1458–1464.

Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 2003; 552, 335–344.

Turrens, J.F. Regulation of mitochondrial respiration in heart muscle. *Mitochondria: The Dynamic Organelle.* Springer Science and Business Media. 2007; 185–196.

Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777:1092–1097.

Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777:1092–7.

Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H. Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADPribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem.* 1982; 257:6084–6088.

Vamecq J, Draye JP. Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays Biochem.* 1989;24:115-225.

Van Linthout, S.; Spillmann, F.; Lorenz, M.; Meloni, M.; Jacobs, F.; Egorova, M.; Stangl, V.; De Geest, B.; Schultheiss, H.P.; Tschöpe, C. Vascular-protective effects of high-density lipoprotein include the downregulation of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension.* 2009; 53:682-687.

Vanhoutte, P.M.; Miller, V.M. Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1985; 7:S12-S23.

Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9220–9225.

Vicent D, Ilany J, Kondo T, et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;111:1373–80.

Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep.* 2003; 3:279–288.

Vosper H, Patel L, Graham TL, Khoudoli GA, Hill A, Macphee CH, Pinto I, Smith SA, Suckling KE, Wolf CR, Palmer CN. The peroxisome proliferator-

activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem.* 2001;276:44258-65.

Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res.* 2001;9:414-7.

Wagner KD, Wagner N. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) acts as regulator of metabolism linked to multiple cellular functions. *Pharmacol Ther.* 2010;125:423-35.

Wagner N, Jehl-Piétri C, Lopez P, Murdaca J, Giordano C, Schwartz C, Gounon P, Hatem SN, Grimaldi P, Wagner KD. Peroxisome proliferator-activated receptor beta stimulation induces rapid cardiac growth and angiogenesis via direct activation of calcineurin. *Cardiovasc Res.* 2009;83:61-71.

Wallis MG, Smith ME, Kolka CM, et al. Acute glucosamine-induced insulin resistance in muscle in vivo is associated with impaired capillary recruitment. *Diabetologia* 2005; 48:2131-2139.

Wang D, Wang H, Shi Q, Katkuri S, Walhi W, Desvergne B, Das SK, Dey SK, DuBois RN. Prostaglandin E(2) promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Cancer Cell.* 2004;6:285-95.

Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003; 113:159-170.

Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6712-7.

Wendt, M.C.; Daiber, A.; Kleschyov, A.L.; Mülsch, A.; Sydow, K.; Schulz, E.; Chen, K.; Keaney, J.F. Jr.; Lassègue, B.; Walter, U.; Griendling, K.K.; Münzel, T. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 39:381-391.

West E, Simon OR, Morrison EY. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J.* 1996; 45: 60-62.

Westergaard M, Henningsen J, Svendsen ML, Johansen C, Jensen UB, Schröder HD, Kratchmarova I, Berge RK, Iversen L, Bolund L, Kragballe K, Kristiansen K. Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid. *J Invest Dermatol.* 2001;116:702-12.

Wheatcroft SB, Shah AM, Li JM, et al. Preserved gluco-regulation but attenuation of the vascular actions of insulin in mice heterozygous for knockout of the insulin receptor. *Diabetes.* 2004;53:2645–52.

Wheatcroft SB, Williams IL, Shah AM, Kearney MT. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med.* 2003;20:255–68.

White M.F., Insulin signaling in health and disease, *Science.* 2003; 302:1710–1711.

Widlansky ME, Vita JA, Wang J, Kizhakekuttu TJ, Arthur EIL, Gutterman DD. Mitochondrial membrane hyperpolarization and reduced mitochondrial mass

characterize the arteriolar endothelium and mononuclear cells of humans with Type 2 diabetes mellitus- in vivo and in vitro assessment of mitochondrial function [abstr]. *Circulation*. 2009;120:S1107.

Wigg, S.J.; Tare, M.; Tonta, M.A.; O'Brien, R.C.; Meredith, I.T.; Parkington, H.C. Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281:H232-H240.

Williams, S.B., Cusco, J.A., Roddy M., Johnstone, M.T., Creager, M.A. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27: 567–574.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD and Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43:527-50.

Winzell, M.S., Wulff, E.M., Olsen, G.S., Sauerberg, P., Gotfredsen, C.F., Ahrén, B. Improved insulin sensitivity and islet function after PPAR δ activation in diabetic db/db mice. *European Journal of Pharmacology.* 2010; 626:297-305.

Woo CH, Massett MP, Shishido T, et al. ERK5 activation inhibits inflammatory responses via peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) stimulation. *J Biol Chem.* 2006;281:32164-32174.

Xu B, Chibber R, Ruggiero D, et al. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *Faseb J.* 2003; 17:1289–1291.

Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV.

Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*. 1999;3:397-403.

Yamada M, Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, Naruse K, Matsui H, Ito T, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer modulates cyclooxygenase-2-derived prostanoid synthesis and inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:256-62.

Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294:284–286

Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol. Chem*. 1995;270:23975-23983.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*. 2001;293:1673–7.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention evaluation study investigators. *N Engl J Med*. 2000;342:145–153.

Zanetti, M.; Barazzoni, R.; Stebel, M.; Roder, E.; Biolo, G.; Baralle, F.E.; Cattin, L.; Guarnieri, G. Dysregulation of the endothelial nitric oxide synthase-soluble guanylate cyclase pathway is normalized by insulin in the aorta of diabetic rat. *Atherosclerosis*. 2005; 181:69-73.

Zarzuelo, M.J.; Jiménez, R.; Galindo, P.; Sánchez, M.; Nieto, A.; Romero, M.; Quintela, A.M.; López-Sepúlveda, R.; Gómez-Guzmán, M.; Bailón, E.; Rodríguez-Gómez, I.; Zarzuelo, A.; Gálvez, J.; Tamargo, J.; Pérez-Vizcaíno, F.; Duarte, J. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor- β activation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2011; 58:733-743.

Zenere, B.M., Arcaro, G., Saggiani, F., Rossi, L., Muggeo, M. and Lechi, A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Care*. 1995; 18: 975–982.

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, et al. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. 2000;101:1539–45.

Zeng, G., and Quon, M. J. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 894–898.

Zhang H, Pi R, Li R, Wang P, Tang F, Zhou S, Gao J, Jiang J, Chen S, Liu P. PPARbeta/delta activation inhibits angiotensin II-induced collagen type I expression in rat cardiac fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*. 2007;460:25-32.

Zhang J, Fu M, Zhu X, Xiao Y, Mou Y, Zheng H, Akinbami MA, Wang Q, Chen YE. Peroxisome proliferator-activated receptor δ is up-regulated during vascular lesion formation and promotes post-confluent cell proliferation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2002;277:11505-12.

Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:25500-6.

Zorzano A, Liesa M, Palacin M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:1846–54.

Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 2002;109:817–826.