

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Papel protector de los agonistas de receptores
activados por el proliferador de peroxisomas
(PPAR)- β/δ sobre el desarrollo de hipertensión**

**Tesis Doctoral para aspirar
al Grado de Doctora que presenta la
Licenciada Maria José Zarzuelo Romero, 2012**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María José Zarzuelo Romero
D.L.: GR 2143-2012
ISBN: 978-84-9028-007-2



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 protector de los agonistas de receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR)- β/δ sobre el desarrollo de hipertensión”, ha sido realizada por la Licenciada en Farmacia Dña. Maria José Zarzuelo Romero, en los laboratorios de este Departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a 1 de diciembre de 2011.

Dr. Julio Gálvez Peralta



UNIVERSIDAD
DE
GRANADA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

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

Certifican: que la Tesis Doctoral titulada “Papel protector de los agonistas de receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR)- β/δ sobre el desarrollo de hipertensión”, presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Maria José Zarzuelo Romero, 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 1 de diciembre de 2011.

Dr. Juan Manuel Duarte Pérez

Dra. Rosario Jiménez Moleón

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

“La posibilidad de realizar un sueño
es lo que hace que la vida sea interesante”
Paulo Coelho

“No hay enigmas, si un problema puede plantearse,
es que puede resolverse”
Ludwig Wittgenstein

Abreviaturas empleadas**AA**

Ácido araquidónico.

ABCA1

Transportadores de membrana dependientes de ATP.

ACh

Acetilcolina.

ADP

Adenosín difosfato.

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.

ANGPTL

Angiopoyetina.

AP-1

Proteína activadora-1.

apoA1

Apolipoproteína A1.

ARA-II

Antagonistas del receptor de angiotensina II.

ARN

Ácido ribonucleico.

ARNm

Ácido ribonucleico mensajero.

AT-1

Receptor 1 de angiotensina II.

AT-2

Receptor 2 de angiotensina II.

ATP

Adenosín trifosfato.

AUC

Área bajo la curva.

BAPTA/AM

Ácido 1,2-bis-(o-aminofenoxi) etano-N, N, N', N'-tetracético acetoximetil éster.

BCA

Ácido bicinconínico.

BCL-6

Proteína 6 del linfoma de células B.

BH₂

Dihidrobiopterina.

BH₄

Tetrahidrobiopterina.

BHT

Butilato hidroxitolueno.

Big-Ets

Endotelinas de
37-41 aminoácidos.

BSA

Albúmina de suero bovino.

[Ca²⁺]_i

Concentración intracelular de calcio.

Cam

Calmodulina.

cAMP

Adenosín monofosfato cíclico.

Cat

Catalasa.

CDKs

Kinasas dependientes de ciclinas.

cDNA

DNA complementario

cGMP

Guanosín monofosfato cíclico.

CGRP

Péptido relacionado con el gen de calcitonina.

CMLV

Célula del músculo liso vascular.

COMT

Catecol-o-metil transferasa.

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. | FBS Suero fetal bovino. |
| DMSO Dimetilsulfóxido. | FC Frecuencia cardíaca |
| DNA Ácido desoxirribonucleico. | FCDE Factores contractores derivados de endotelio. |
| DOC Desoxicortecosterona. | GLUT Transportador de la glucosa. |
| DOCA Acetato de deoxicortecosterona | GPx Glutation peroxidasa. |
| DPI Difeniléniodonio. | GRO Oncogen regulador del crecimiento. |
| 15d-PGJ2 Deoxiprostaglandina J2. | GSH Glutación. |
| DTT Ditiotreitíol. | GST Glutation S-transferasa. |
| EDCF Factor endotelal constrictor. | GTP Guanosín trifosfato. |
| EDTA Ácido etilendiamino tetracético. | HDL Lipoproteínas de alta densidad. |
| EGTA Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético. | HEPES Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico. |
| eNOS Óxido nítrico sintasa endotelial. | HETE Ácido hidroxieicosatetraenoico. |
| ERK 1/2 Kinasas reguladas por señales extracelulares 1/2. | HODE Ácido hidroxioctadecadienoico. |
| ET-1 Endotelina 1. | 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.

IFN- γ

Interferón- γ

IL

Interleukina

iNOS

Óxido nítrico sintetasa inducible.

i.p.

Intraperitoneal.

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^o-nitro-L-arginina metil éster.

LPL

Lipoproteína lipasa.

Lpm

Latidos por minuto.

LPS

Lipopolisacárido.

LTB₄

Leucotrieno B₄

| | |
|--|---|
| M Molar. | NF-κB Factor de transcripción nuclear κ B. |
| 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. | Nrf2 Factor nuclear eritroide 2. |
| Mn-SOD SOD dependiente de manganeso. | O₂⁻ Anión superóxido. |
| mRNA Ácido ribonucleico mensajero. | ob/ob Obeso |
| MTC Tricómico de Masson. | OH⁻ Radical hidroxilo. |
| NA Noradrenalina. | ONOO⁻ Peroxinitrito. |
| NAD⁺ Nicotinamín adenín dinucleótido oxidado. | PAM Presión arterial media |
| NADPH Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato. | 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 kinasa 4.

PGC

Coactivadoras de PPAR γ .

PGH₂

Prostaglandina H₂.

PGI₂

Prostaciclina.

PGs

Prostaglandinas.

PI3K

Fosfatidil inositol-3-kinasa.

PLA₂

Fosfolipasa A₂.

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 kinasa.

PTP

Protein tirosina fosfatasa.

PVDF

Fluoruro de polivinilideno.

PVI

Peso de ventrículo izquierdo.

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.

SHR

Rata espontáneamente hipertensa.

SHR-SP

SHR con tendencia a infarto cerebral.

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.

TBARs

Substancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

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 .

TRIS

Tris (hidroximetil) aminometano.

TXA₂

Tromboxano A₂.

U

Unidades.

U46619

9,11-didesoxi-11 α , 9 α -F_{2 α} epoximetanoprostaglandina.

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.

vs

Versus

WKY

Wistar-Kyoto.

XO

Xantina oxidasa.

Índice.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Introducción..... | 3 |
| 1. RECEPTORES ACTIVADOS POR EL PROLIFERADOR DE PEROXISOMAS..... | 3 |
| 1.1. Receptores..... | 3 |
| 1.1.1. Introducción..... | 3 |
| 1.1.2. Características estructurales y mecanismo de acción..... | 4 |
| 1.1.3. Co-activadores/represores de PPARs..... | 6 |
| 1.1.4. Tipos de receptores PPAR..... | 9 |
| a) <i>PPARα</i> | 9 |
| b) <i>PPARγ</i> | 10 |
| c) <i>PPARβ</i> | 12 |
| 1.2. Ligandos específicos PPARβ..... | 12 |
| 1.3. Efectos de los PPARβ..... | 14 |
| 1.3.1. PPAR β y el tejido adiposo..... | 16 |
| 1.3.2. PPAR β y el músculo esquelético..... | 18 |
| 1.3.3. PPAR β y el sistema cardiovascular..... | 24 |
| - Función cardíaca/miocitos..... | 24 |
| - PPAR β y células vasculares..... | 27 |
| 1. Células endoteliales..... | 27 |
| 2. Células músculo liso vascular..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Fibroblastos..... | 30 |
| 4. Macrófagos..... | 30 |
| - PPAR β y enfermedades cardiovasculares..... | 31 |
| a) Aterosclerosis..... | 31 |
| b) Isquemia /reperfusión..... | 34 |
| c) Hipertrofia cardíaca..... | 35 |
| | |
| 2. EL MODELO ANIMAL DE HIPERTENSIÓN GENÉTICA. LAS RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS O SHR..... | 36 |
| 2.1. Volumen de líquido circulante..... | 37 |
| 2.2. Sistema nervioso..... | 37 |
| 2.3. Estructura vascular..... | 38 |
| 2.4. Sistema renina-angiotensina..... | 40 |
| 2.5. Función endotelial..... | 41 |
| | |
| 3. HIPERTENSIÓN DOCA-SAL O HIPERTENSIÓN VOLUMEN DEPENDIENTE..... | 46 |
| 3.1. Generalidades de la hipertensión DOCA-sal..... | 46 |
| 3.2. Patogénesis de la hipertensión DOCA-sal..... | 47 |
| 3.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión DOCA-sal..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4. Reactividad vascular en la hipertensión DOCA-sal..... | 53 |
| 3.5. Estrés oxidativo e hipertensión DOCA-sal..... | 55 |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS..... | 61 |
| JUSTIFICATION AND AIMS..... | 69 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 75 |
| 1. EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>..... | 75 |
| 1.1. Agonistas PPAR β objeto de estudio..... | 75 |
| 1.2. Animales de experimentación..... | 76 |
| 1.3. Aislamiento e incubación de los anillos aórticos de rata..... | 76 |
| 1.4. Estudios de reactividad vascular..... | 76 |
| 1.5. Fosforilación de proteínas en HUVECs..... | 80 |
| 1.5.1. Cultivo primario de células endoteliales..... | 80 |
| 1.5.2. Western blot..... | 81 |
| 1.6. La cuantificación del óxido nítrico liberado por diaminofluoresceína- 2 en HUVECs..... | 82 |
| 1.7. Reactivos..... | 83 |
| 1.8. Análisis estadístico..... | 84 |

| | |
|---|-----------|
| 2. EFECTOS <i>IN VIVO</i> DEL AGONISTA DE PPARB, GW0742, SOBRE MODELOS DE HIPERTENSIÓN EXPERIMENTAL..... | 84 |
| 2.1. Animales y grupos experimentales..... | 84 |
| 2.1.1. Experimento I: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión en ratas SHR..... | 84 |
| 2.1.2 Experimento II: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión en ratas DOCA-sal..... | 85 |
| 2.2 Medida de la presión arterial..... | 86 |
| 2.3 Parámetros morfológicos..... | 87 |
| 2.4. Estudios de reactividad vascular..... | 88 |
| 2.4.1. Protocolos experimentales <i>ex vivo</i> | 89 |
| 2.4.2. Experimentos <i>in vitro</i> | 90 |
| 2.5. Determinaciones en orina..... | 91 |
| 2.5.1. Determinación de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) F _{2α} | 91 |
| 2.6. Determinaciones en plasma..... | 91 |
| 2.6.1. Determinación del nivel de peroxidación lipídica..... | 92 |
| 2.6.2. Determinación de los niveles de ET-1 (Experimento II)..... | 92 |
| 2.6.3. Prueba de tolerancia oral a la glucosa (Experimento I)..... | 93 |
| 2.7 Análisis histológico (Experimento I)..... | 93 |
| 2.8. Medición de la producción vascular de O ₂ ⁻ | 94 |
| 2.9. Detección <i>in situ</i> del contenido vascular de O ₂ ⁻ (Experimento I)..... | 95 |

| | |
|--|------------|
| 2.10. Expresión vascular de diferentes proteínas mediante Western Blot | 96 |
| 2.11. Expresión de diferentes genes mediante PCR | 99 |
| 2.12. Análisis estadístico | 101 |
| 2.13. Reactivos | 102 |
| RESULTADOS | 107 |
| 1. RESULTADOS DE REACTIVIDAD VASCULAR | 107 |
| 1.1. Efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β | 107 |
| 1.2. El papel de PPAR β y PPAR γ sobre los efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β | 109 |
| 1.3. Implicación del calcio en los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio de los agonistas PPAR β | 110 |
| 1.4. Papel de la PI3-kinasa en los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio producidos por los agonistas PPAR β | 111 |
| 1.5. Efectos de los agonistas PPAR β en la producción de óxido nítrico en HUVECs | 112 |
| 1.6. Efectos de los agonistas PPAR β en la fosforilación de AKT y eNOS en HUVECs | 114 |
| 2. EFECTOS <i>IN VIVO</i> DEL AGONISTA PPARβ, GW0742, SOBRE LA HIPERTENSIÓN | 115 |

| | |
|--|-----|
| A. Experimento I: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión genética en ratas SHR..... | 115 |
| 2.1. Efectos de GW0742 sobre la presión arterial, variables morfológicas y determinaciones plasmáticas y urinarias..... | 115 |
| 2.2. Efectos de GW0742 sobre genes diana de PPAR β en la aorta.... | 120 |
| 2.3. GW0742 mejora la disfunción endotelial en SHR al aumentar la actividad de eNOS..... | 122 |
| 2.4. GW0742 redujo la producción de ROS vasculares en SHR al reducir la actividad NADPH oxidasa..... | 125 |
| 2.5. GW0742 redujo la respuesta inflamatoria vascular en SHR..... | 128 |
| 2.6. GW0742 regula la fosforilación de ERK1/2 y de AKT en aorta... | 129 |
| 2.7. GW0742 aumenta la expresión de reguladores de la señal del receptor acoplado a proteínas G (RGS) en aorta..... | 130 |
| 2.8. Efectos <i>in vitro</i> del ligando PPAR β sobre la contractilidad y la actividad NADPH oxidasa en aorta..... | 131 |
| | |
| B. Experimento II: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión en ratas DOCA-sal..... | 135 |
| 2.9. Efectos de GW0742 sobre la presión arterial, variables morfológicas y determinaciones plasmáticas y urinarias..... | 135 |

| | |
|--|------------|
| 2.10. Efectos de GW0742 sobre los genes diana de PPAR β en la aorta..... | 138 |
| 2.11. GW0742 mejora la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal..... | 139 |
| 2.12. GW0742 redujo la producción de ROS vasculares en DOCA-sal al reducir la actividad NADPH oxidasa..... | 141 |
| 2.13. Efectos de GW0742 en la síntesis de ET-1..... | 143 |
| 2.14. GW0742 aumentó los reguladores de la señal del receptor acoplado a proteínas G (RGS) en aorta..... | 144 |
| 2.15. GW0742 mejora la disfunción endotelial aórtica <i>in vitro</i> inducida por ET-1..... | 145 |
| 2.16. GW0742 indujo respuestas vasodilatadoras <i>in vitro</i> en arterias mesentérica..... | 146 |
| DISCUSIÓN..... | 149 |
| 1. Efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β | 149 |
| 1.1. Papel de los PPAR β | 149 |
| 1.2. Papel del endotelio y el NO..... | 151 |
| 1.3. Papel del músculo liso vascular..... | 153 |
| 2. Efecto antihipertensor de la activación PPAR β en SHR..... | 155 |
| 2.1. Participación de PPAR β en los efectos protectores..... | 156 |
| 2.2. Efectos protectores sobre la morfología y la histología cardíaca, renal y vascular..... | 157 |

| | |
|---|------------|
| 2.3. Papel de las ROS en la disfunción endotelial..... | 158 |
| 2.4. Efectos sobre la inflamación vascular..... | 159 |
| 2.5. Participación de RGS..... | 160 |
| 3. Efecto antihipertensor de la activación PPAR β en la hipertensión inducida por mineral corticoides..... | 162 |
| 3.1. Papel del sistema de endotelina..... | 163 |
| 3.2. Efectos sobre la morfología cardíaca..... | 165 |
| 3.3. Efectos sobre la disfunción endotelial y las ROS..... | 165 |
| 3.4. Papel de las RGS..... | 167 |
| 4. Perspectivas..... | 169 |
| | |
| CONCLUSIONES..... | 173 |
| CONCLUSIONS..... | 177 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 181 |

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

Figura 1. Esquema representativo de los dominios funcionales de PPARs y la similitud entre las isoformas.....5

Figura 2. Mecanismo de acción de PPARs.....8

Figura 3. Esquema de las acciones metabólicas de PPAR β23

Figura 4. Esquema de las acciones de PPAR β relacionadas con el metabolismo en tejido adiposo, músculo esquelético y corazón.....27

Figura 5. Efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β108

Figura 6. Efectos del antagonista PPAR γ , GW9662 y del antagonista PPAR β , GSK0660 en las respuestas vasodilatadoras inducidas por los agonistas PPAR β109

Figura 7. Efectos vasodilatadores de ACh y NPS no se vieron afectados por el antagonista PPAR γ , GW9662 ó el antagonista PPAR β , GSK0660.....110

Figura 8. La participación de Ca^{2+} en los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio de los agonistas PPAR β111

Figura 9. Efecto del inhibidor de PI3K, LY-294002, en las respuestas vasodilatadoras inducidas por los agonistas de PPAR β112

Figura 10. Medida de NO por DAF-2 en HUVEC estimuladas con A23187 (1 μ M) ó L165041 (L, 1, 10 y 30 μ M) ó GW0742 (GW, 1, 10 y 30 μ M).....113

Figura 11. Efectos de L165041 (10 μ M) ó GW0742 (10 μ M), en HUVECs solas o preincubadas ya sea con el inhibidor de PI3K, LY-294002 (1 μ M), el antagonista PPAR β , GSK0660 (1 μ M), o el antagonista PPAR γ , GW9662 (1 μ M), a nivel de proteínas como fosfo-AKT y fosfo-eNOS).....114

Figura 12. Efectos de la administración crónica de GW0742 sobre la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca, medida por pletismografía en SHR.....115

Figura 13. . El análisis histológico de los efectos de GW0742 en el corazón y el riñón.....117

Figura 14. Efectos de GW0742 sobre los parámetros morfológicos de las arterias mesentéricas.....118

| | |
|---|-----|
| Figura 15. Efectos de GW0742 en la prueba de tolerancia oral a la glucosa..... | 120 |
| Figura 16. Efectos de GW0742 en genes diana PPAR β en aorta... | 121 |
| Figura 17. Efectos del GW0742 en los niveles de mRNA de PPAR β en riñón y corazón, y de PDK4 en corazón de SHR y WKY..... | 122 |
| Figura 18. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial..... | 123 |
| Figura 19. Efectos de GW0742 sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en ausencia y presencia de L-NAME (100 μ M) en ratas WKY y SHR control y tratadas..... | 124 |
| Figura 20. Efectos de GW0742 sobre la vía del NO..... | 125 |
| Figura 21. Efectos de GW0742 en la producción de O ₂ ⁻ | 126 |
| Figura 22. Efectos de GW0742 sobre el contenido de iso-PGF _{2a} en la aorta..... | 127 |
| Figura 23. Efectos de GW0742 en la vía de la NADPH oxidasa..... | 128 |

Figura 24. Efectos de GW0742 en la expresión mRNA de genes proinflamatorios.....129

Figura 25. Efectos de GW0742 sobre las vías de ERK y AKT.....130

Figura 26. Efectos de GW0742 sobre la expresión de mRNA de las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS).....131

Figura 27. Efectos in vitro de GW0742 en respuesta a vasoconstrictores.....132

Figura 28. Efectos in vitro de GW0742 sobre la actividad NADPH oxidasa.....133

Figura 29. Efectos in vitro de GW0742 en la expresión de mRNA de AT_1 y ET_A y de RGS4 y RGS5.....134

Figura 30. Efectos de la administración crónica de GW0742 sobre la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca.....136

Figura 31. Efectos de GW0742 sobre el contenido plasmático de MDA y la excreción urinaria de iso-PGF_{2a}.....138

Figura 32. Efectos de GW0742 en genes diana PPAR β en aorta...139

| | |
|--|-----|
| Figura 33. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial..... | 140 |
| Figura 34. Efectos de GW0742 en la producción de O ₂ ⁻ | 141 |
| Figura 35. Efectos de GW0742 en la vía de la NADPH oxidasa... | 142 |
| Figura 36. Efectos de GW0742 en la síntesis de ET-1..... | 143 |
| Figura 37. Efectos de GW0742 sobre la expresión de mRNA de las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G..... | 144 |
| Figura 38. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial <i>in vitro</i> inducida por ET-1..... | 145 |
| Figura 39. Efectos vasodilatadores <i>in vitro</i> de GW0742 en arterias mesentéricas..... | 146 |
| Figura 40. Esquema representativo del efecto vasodilatador dependiente de endotelio de los agonistas PPAR β | 153 |
| Figura 41. Esquema de los efectos de GW0742 sobre la expresión de las RGS en SHR, y por tanto su actuación sobre las acciones mediadas por la Ang II..... | 161 |

Figura 42. Efectos de GW0742 a la dosis de 20 mg/Kg sobre la expresión de RGS en las ratas DOCA-sal, y por tanto sus actuación sobre las acciones mediadas por la ET-1.....168

Tablas

Tabla 1. Ligandos de PPAR β14

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en las determinaciones de expresión proteica.....98

Tabla 3. Secuencia de primers.....99

Tabla 4. Peso corporal y de los órganos e índices cardíaco y renal..116

Tabla 5. Determinaciones plasmáticas y urinarias en WKY y SHR controles y tratadas con GW0742.....119

Tabla 6. Peso corporal y de los órganos e índices cardíaco y renal..137

Introducción.

Introducción

1.1. Receptores activados por el proliferador de peroxisomas.

1.1. Receptores.

1.1.1. 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).

1.1.2. 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 γ (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.

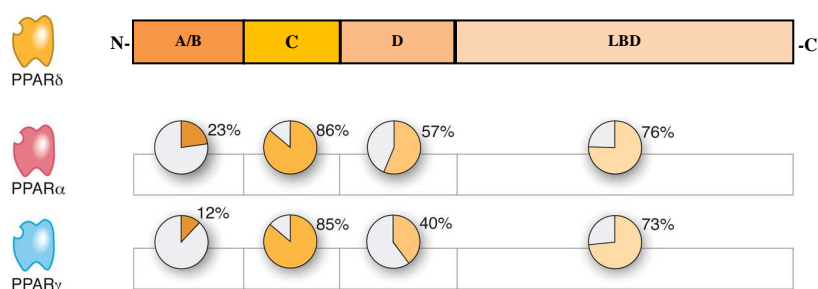


Figura 1. Esquema representativo de los dominios funcionales de PPARs y la similitud entre las isoformas. El dominio amino terminal A/B con acción activadora de la transcripción independiente de ligando (AF-1). El dominio C promueve la unión a una secuencia de DNA. El dominio D o “bisagra” une el dominio 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 (Kleiber *et al.*, 1992; Mangelsdorf y Evans, 1995).

1.1.3. 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 resulta en 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 de la proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Johnson *et al.*, 1997), lo que impide la activación de otros factores de activación que se encuentran más debajo de la cadena de señalización.

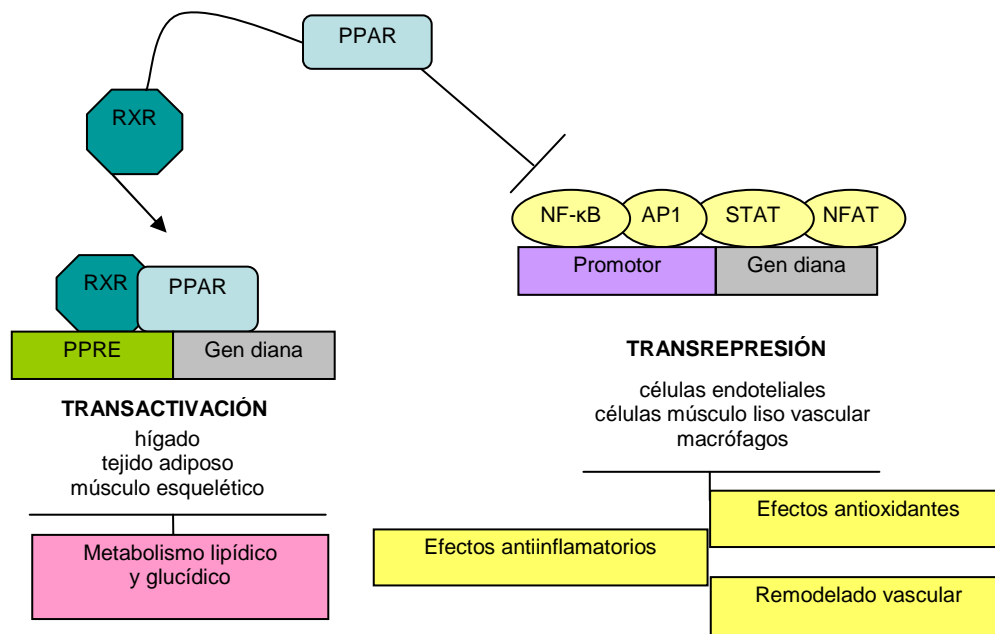


Figura 2. Mecanismo de acción de PPARs. Tras la activación por ligandos específicos, PPAR se heterodimeriza con RXR y se une al PPRE específico sobre el promotor de los genes diana, regulando el metabolismo glucídico y lipídico. Este proceso es denominado **transactivación** (izquierda). PPARs también interactúa con diferentes factores de transcripción (NF-κB, AP-1, STAT and NFAT) independientemente de la unión al DNA, de esta forma reprime la transcripción de genes proinflamatorios y prooxidantes. Este proceso es denominado **transrepresión** (derecha).

1.1.4. 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 ciclooxygenasa 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-hidroxiocetadecadienoico (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 , tumour 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), colón (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 angiotensina II (Ang II), la activación de la fosfato dinucleótido nicotinamida-adenina (NADPH, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), 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.

1.2. 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 (ver 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 | μ M | |
| Ácidos grasos saturados | Ácidos grasos de la dieta | μ M | |
| Prostaglandín A1 | Prostaglandina endógena | μ M | |
| <i>Agonistas sintéticos</i> | | | |
| Carbaprostaciclina | Análogo sintético estable de PGI ₂ | μ M | |
| Iloprost | Análogo de prostaciclina | μ M | |
| 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 | | |

1.3. 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 $-\gamma$, 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 esté 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 de hecho 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 (ERK5, *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.

1.3.1. 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.

1.3.2. 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), 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 diacilglicerol (DAG) y la subsiguiente activación de la proteína cinasa C θ (PKC θ). En células de músculo esquelético, C2C12, el agonista GW501516 previene la fosforilación del sustrato de receptor de insulina (IRS-1, *Insulin Receptor Substrate-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 sobre-expresión 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).

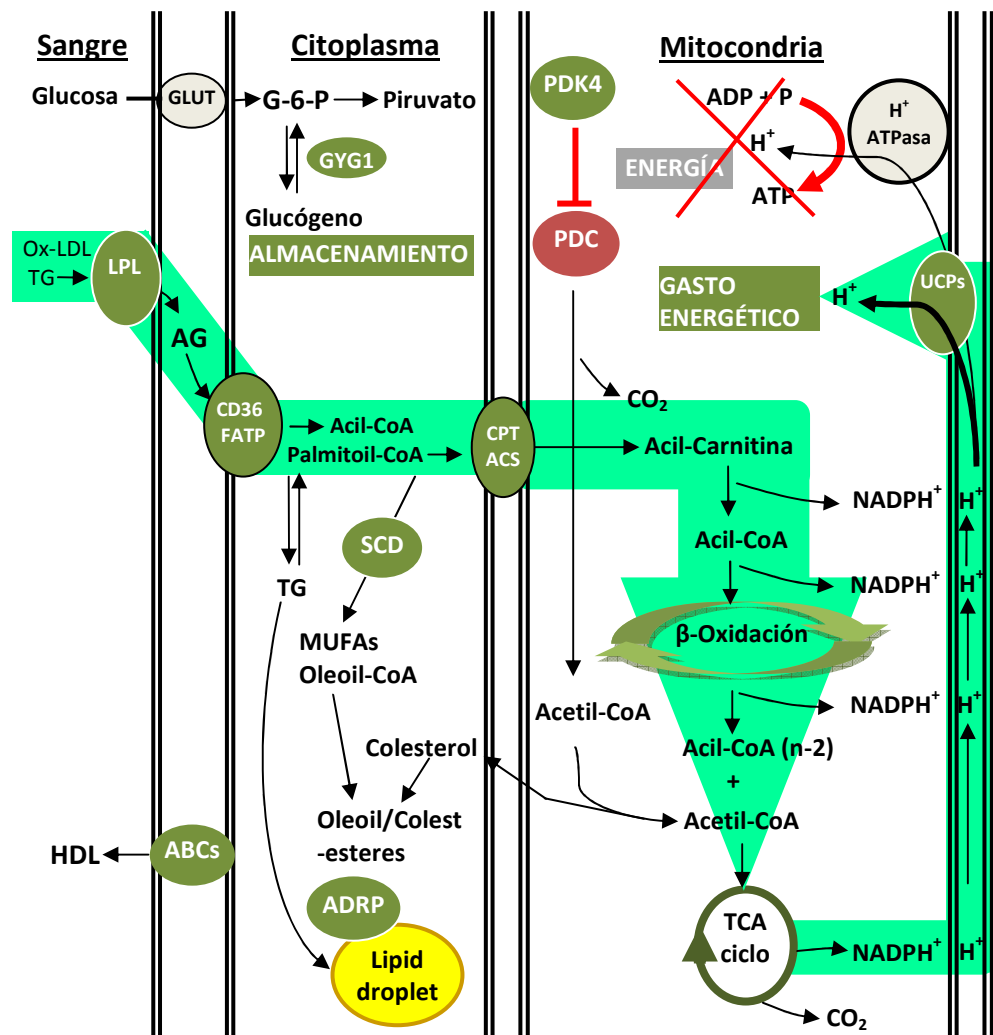


Figura 3. Esquema de las acciones metabólicas de PPAR β . Las enzimas y funciones que son activadas por PPAR β están marcadas en verde. El color rojo indica la inhibición de vías. Las flechas en verde representan la absorción y oxidación de ácidos grasos (AG), seguido del desacoplamiento de la oxidación 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.

1.3.3. 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 angiotensina II (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 .

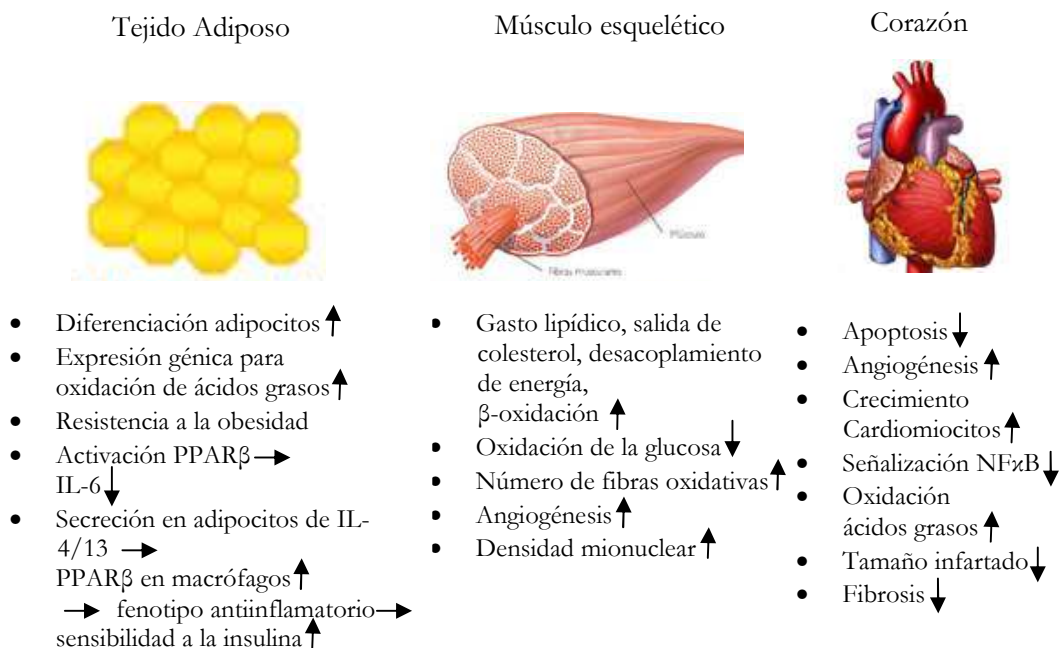


Figura 4. Esquema de las acciones de PPARβ relacionadas con el metabolismo en tejido adiposo, músculo esquelético y corazón.

-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 células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVECs, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) 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 fosfatidilinositol 3-kinasa (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 post capilares 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 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 la molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1, *InterCellular Adhesion Molecule-1*), molécula-1 de adhesión vascular (VCAM-1, *Vascular Cellular Adhesion Molecule-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 kinasa 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 interleukina 1 β (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 neoíntima 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 , PGI₂, 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, -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 óxido nítrico (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 el 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 . Calcineurina es identificado 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 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 PDK-4, y lleva a 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.

2. El modelo animal de hipertensión genética. Las ratas espontáneamente hipertensas o SHR.

El desarrollo de varias especies de ratas caracterizadas por presentar una hipertensión similar a la de humanos, determinada genéticamente, tiene un gran interés desde el punto de vista práctico y teórico. Entre los modelos experimentales de este tipo de hipertensión se encuentran aquellos que utilizan una determinada especie de ratas espontáneamente hipertensas, las SHR, y sus subespecies.

La primera referencia sobre SHR la encontramos en un artículo de Okamoto y Aoki (1963), donde se describía cómo la endogamia sistemática entre animales de la especie WKY (Wistar Kyoto), seleccionados por tener presiones arteriales elevadas, daba lugar a descendientes con valores de presión arterial considerablemente mayores que las de las especies progenitoras. Con posterioridad, fueron surgiendo subespecies de SHR que poseían, entre otras particularidades, una diferente vulnerabilidad a las lesiones vasculares. En todas ellas se sugirió una herencia poligénica (Louis *et al.*, 1969), donde varios componentes genéticos parecen actuar sinérgicamente.

En este modelo experimental, la hipertensión se caracteriza por desarrollarse gradualmente, de forma que se pueden diferenciar dos fases fundamentales: una fase de hipertensión lábil, que comienza a la edad de 4-6 semanas, y una fase de hipertensión establecida, que se alcanza a los 3-4 meses; además, el aumento de

presión arterial se genera y se mantiene por un incremento de la resistencia vascular periférica, atribuida en su fase inicial, a una vasoconstricción funcional neurogénica y, posteriormente, a cambios estructurales vasculares relacionados con una síntesis acelerada de proteínas vasculares.

La elevación sostenida de la presión arterial requiere de la presencia, al menos, de una de las siguientes anormalidades: aumento del gasto cardíaco, resistencia periférica aumentada y disminución en la capacidad renal de excretar sodio. A su vez, estas alteraciones se producen por modificación de distintos parámetros biológicos.

2.1. Volumen de líquido circulante.

En SHR, el gasto cardíaco es normal o está reducido, aunque algunos estudios describen un incremento del mismo en el estadio precoz de la hipertensión, atribuido a un aumento de la frecuencia cardíaca (Lundin y Hallback-Nordlander, 1980). Respecto a la regulación del volumen, la utilización renal de sodio y agua es normal, pero los riñones necesitan una mayor presión de perfusión para mantener su funcionalidad. La tasa de filtración glomerular sólo está reducida en los estadios avanzados de la hipertensión, cuando ya hay complicaciones vasculares renales extensas.

En definitiva, se puede decir que los factores relacionados con el volumen de líquido circulante no desempeñan un papel especialmente importante en el desarrollo de esta hipertensión (Trippodo *et al.*, 1978).

2.2. Sistema nervioso.

El incremento de la actividad del sistema nervioso simpático contribuye al desarrollo de hipertensión, debido a un aumento en la retención renal de sodio. De hecho, la enervación renal retrasa el desarrollo de la hipertensión en ratas

jóvenes, de 7 semanas de edad (estadio precoz) (Winternitz, 1980); sin embargo, en la fase de hipertensión establecida (más de 18 semanas) no se producen cambios en los niveles de presión arterial.

Varios estudios han demostrado que son los mecanismos peptidérgicos y catecolaminérgicos centrales los que están alterados en varias regiones cerebrales, como el núcleo hipotalámico (Saavedra *et al.*, 1978 y Versteeg *et al.*, 1976). También se ha encontrado elevada la actividad de los sistemas hipotalámico-tiroideo e hipotalámico-corticoideo.

Graham y colaboradores (1982) demostraron la existencia de un incremento en la densidad de los receptores α_2 y β_1 adrenérgicos en preparaciones de membrana renal de SHR respecto a las de ratas WKY, lo que explicaría la mayor retención de sodio que tiene lugar en este modelo de hipertensión. Se cree que el receptor α_2 adrenérgico del túbulo proximal es un sitio probable de anomalía que predispone al desarrollo de hipertensión genética en SHR.

El sistema nervioso simpático parece participar, pues, de forma decisiva en la patogénesis del modelo de hipertensión genética SHR.

2.3. Estructura vascular.

El cambio hemodinámico más importante para el mantenimiento de esta hipertensión es el incremento de las resistencias periféricas totales. Doyle y Black (1955) demostraron que la hipertensión está asociada con un aumento en la reactividad del antebrazo (la infusión de agonistas provocó una mayor respuesta presora en los pacientes con hipertensión esencial que en los normotensos). Con posterioridad, Folkow relacionó, incluso desde el punto de vista cuantitativo, estos incrementos de la resistencia vascular y de la reactividad con las alteraciones que tienen lugar en la arquitectura de la pared vascular, y sugirió, que la hipertensión no cursa necesariamente con cambios en el acoplamiento excitación-contracción (Folkow, 1978 y Folkow *et al.*, 1958). Demostró que las alteraciones en la

estructura vascular consisten en el engrosamiento de la túnica media hacia el lumen, que disminuye su diámetro, y en el consiguiente aumento de la relación existente entre el grosor de la capa media y el diámetro del lumen (media/lumen).

Estos cambios han sido confirmados posteriormente por otros autores en pequeñas arterias subcutáneas procedentes de la región glútea (Schiffirin *et al.*, 1992; Izzard *et al.*, 1991; Korsgaard *et al.*, 1991 y Aalkjaer *et al.*, 1987). En modelos animales de hipertensión esencial, como el SHR, se han observado cambios similares en la estructura de las pequeñas arterias (disminución del lumen e incremento de la relación media/lumen) independientemente de la técnica utilizada para su detección (miográfica o histológica) o del vaso de resistencia examinado: mesentérico (Deng y Schiffirin, 1992 y Mulvany *et al.*, 1985), cerebral (Baumbach y Heistad, 1989) o femoral (Bund *et al.*, 1991).

En hipertensos esenciales, estas alteraciones estructurales son consecuencia de la redistribución de los miocitos vasculares normales (a lo que se le denomina remodelado), sin que se modifique su crecimiento ni exista hipertrofia celular. En SHR, este remodelado se acompaña de un incremento en el número de CMLV (hiperplasia), aunque no se observa hipertrofia celular (Heagerty *et al.*, 1993).

Las CMLV reciben estímulos hemodinámicos y humorales anormales que afectan a su crecimiento, disposición geométrica y morfología, y que producen las modificaciones responsables de la aparición de las lesiones descritas. La hipertensión propicia el estiramiento de las células de la pared arterial y, con ello, el aumento de la tensión de la membrana plasmática, lo que da lugar a cambios en el citoesqueleto. En respuesta a estos estímulos se ponen en marcha los mecanismos de síntesis de DNA, RNA y proteínas, lo que se traduce en cambios en su crecimiento, proliferación y capacidad para la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Los mecanismos no hemodinámicos implicados en el desarrollo de estas alteraciones son un condicionamiento genético y el desequilibrio local de sustancias que regulan el ciclo celular, a favor de aquellas que estimulan el crecimiento (Fortuno *et al.*, 1997).

2.4. Sistema renina-angiotensina.

En las ratas jóvenes SHR existe un claro aumento de la resistencia periférica junto con una disminución de la tasa de filtración glomerular y del flujo sanguíneo renal. Estos factores suponen bien un incremento de los sistemas vasoconstrictores, bien una disminución de los sistemas vasodilatadores o ambas cosas. En este modelo de hipertensión, aunque los valores plasmáticos de renina son normales, parece que la alteración del sistema renina-angiotensina representa un importante papel. El contenido renal de renina está elevado en ratas jóvenes (desde el nacimiento hasta 4-6 semanas de edad) (Saito *et al.*, 1976) y desciende con la edad, al contrario de lo que ocurre en ratas WKY, cuya actividad plasmática de renina permanece estable durante toda la vida. Por otra parte, se ha comprobado que la administración crónica de un inhibidor de la enzima de conversión de la Ang II previene el desarrollo de la hipertensión en SHR jóvenes y revierte la hipertensión en SHR adultas, al reducir las resistencias periféricas (Richer *et al.*, 1983). Se han obtenido resultados contradictorios al examinar la reactividad vascular renal a Ang II exógena en riñones aislados y perfundidos de SHR; no obstante, Chatziantoniou y colaboradores (1990) demostraron que la reactividad vascular a Ang II *ex vivo* se duplicaba en ratas SHR respecto de las ratas WKY de la misma edad. Todo esto hace suponer que el sistema renina-Ang está involucrado en la exagerada vasoconstricción que se produce en ratas jóvenes con hipertensión genética. Esta vasoconstricción inducida por la Ang II es posible que se deba a un incremento del número y/o la afinidad de los receptores de Ang II en la vasculatura renal de SHR o a un incremento, en las ratas WKY, de los sistemas vasodilatadores que se oponen a la acción de la Ang II.

Por otra parte, se ha observado que en SHR jóvenes, la Ang II estimula preferentemente la síntesis glomerular y renal de TXA₂, mientras que la producción de PGI₂ predomina en la edad adulta (Konieczkowski *et al.*, 1983). Se supone que la vasculatura de SHR jóvenes es más sensible a Ang II, debido a una

deficiencia de prostanoïdes vasodilatadores endógenos y al consiguiente predominio de los prostanoïdes vasoconstrictores, responsable de la intensa vasoconstricción que caracteriza a este modelo de hipertensión.

Otro hecho que ratifica la participación del sistema renina-Ang en este tipo de hipertensión es la reducción de presión arterial que inducen los antagonistas de los receptores de Ang II (Wong *et al.*, 1990). Dada la actividad plasmática normal de renina en SHR, se ha especulado con la posibilidad de que la renina derivada del riñón contribuya a la generación local de Ang II para mantener el tono vascular en estas ratas. Además, y puesto que los antagonistas de Ang II no promueven la excreción de sodio y agua en este modelo de hipertensión y sí incrementan el flujo plasmático renal, se sugiere que la Ang II contribuye a la elevación de la resistencia vascular renal en SHR. Todos estos datos son bastante consistentes para formular la hipótesis de que el factor responsable de la elevada resistencia periférica y vascular renal en SHR sea una anomalía en el sistema renina-angiotensina tisular (Fenoy *et al.*, 1991).

2.5. Función endotelial.

El endotelio vascular es un “órgano” diana de la hipertensión ya que, como consecuencia de su localización, está expuesto a las fuerzas mecánicas sanguíneas. El principal mecanismo inductor y mediador de la disfunción endotelial hipertensiva es la presión arterial elevada, responsable de un incremento de las fuerzas de cizallamiento sobre las células del endotelio vascular. Ello puede dar lugar a modificaciones estructurales y/o funcionales que afectan a la producción, a la liberación y a los efectos de los distintos agentes vasoactivos (Luscher, 1990). La disfunción endotelial se manifiesta como una reducida respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, o como una mayor respuesta vasoconstrictora (dependiente o independiente de endotelio), ambas resultantes de una alteración del equilibrio que normalmente existe entre factores vasodilatadores y

vasoconstrictores (Lahera *et al.*, 1997). Este desequilibrio conlleva una elevación de las resistencias vasculares periféricas totales y el mantenimiento o agravamiento de la hipertensión arterial.

Se ha observado, tanto en hipertensos esenciales como en modelos experimentales de hipertensión, una alteración en la regulación inducida por NO. Varios estudios han demostrado que, en estos casos, se reduce la liberación de NO (Cosentino *et al.*, 1998 y Tschudi *et al.*, 1996) y, en consecuencia, también la vasodilatación dependiente de NO (Panza *et al.*, 1993 y Lüscher y Vanhoutte, 1986). Esto indica que la hipertensión está relacionada con la disfunción endotelial subyacente en la reducida biodisponibilidad de NO. Sin embargo, esta conclusión se sostiene principalmente por los resultados obtenidos con agonistas que estimulan la formación de NO, pero los datos referentes a la regulación basal del NO en hipertensión son contradictorios. En SHR, los efectos vasoconstrictores observados con inhibidores de NO y la expresión y actividad de la eNOS pueden estar incrementadas (Maffei *et al.*, 2002; Nava *et al.*, 1998; Vaziri *et al.*, 1998 y Radaelli *et al.*, 1998) o disminuidas (Chou *et al.*, 1998). También existen discordancias entre los resultados obtenidos con otros indicadores de la síntesis de NO, como la concentración en plasma y orina de metabolitos de NO (Vaziri *et al.*, 1998) o la formación de cGMP (Ruetten *et al.*, 1999 y Nava *et al.*, 1998). Por lo tanto, la regulación de NO basal en la hipertensión no está suficientemente aclarada. El aumento de la formación basal de NO se interpreta como un intento ineficaz, por parte del endotelio, para equilibrar la excesiva producción vascular de radicales libres derivada del incremento del catabolismo de NO (Nava *et al.*, 1998). En definitiva, aunque la disfunción endotelial hipertensiva se entienda como una respuesta defectuosa a la estimulación de la liberación de NO por agonistas, este concepto tiene que ser también aplicado a la producción de NO basal.

Todos los estudios que se han realizado para analizar la función endotelial en hipertensión han utilizado métodos indirectos (expresión o actividad de eNOS, determinación de metabolitos de NO, etc), lo que supone ciertas limitaciones. La medida directa de la producción de NO requiere técnicas sofisticadas (debido a su

corta vida media y a que se produce en muy poca cantidad) como la fluorescencia DAF-2, que ha permitido observar, en anillos aórticos de SHR, un incremento en la producción de NO basal y una respuesta menor a la liberación de NO inducida por agonistas en comparación con sus controles, las ratas WKY (Maffei *et al.*, 2002).

También se ha sugerido que una producción exagerada de radicales libres sea responsable de la disfunción endotelial en el modelo SHR (Grunfeld *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995). De hecho, la reducción de la producción de O_2^- mediante aloxantina, un inhibidor de la XO (Miyamoto *et al.*, 1996), o mediante CuZn-SOD (Nakazono *et al.*, 1991) disminuye de forma aguda la presión arterial en ratas SHR. También se ha descrito que la administración crónica de antioxidantes como la vitamina E (Chen *et al.*, 2001) revierte la disfunción endotelial hipertensiva y reduce la presión arterial. Estos O_2^- tienen la capacidad, como ya se describió, de oxidar el NO (eliminando así su efecto beneficioso) y producir ONOO⁻, que tiene una potente acción oxidante y produce lesión celular a nivel estructural y molecular (Rubanyi y Vanhoutte, 1986). El ONOO⁻ reacciona con el ácido araquidónico (AA) y produce 8-isoprostaglandina $PGF_{2\alpha}$, que es un potente vasoconstrictor que incrementa la presión arterial (Morrow y Roberts, 1996). Además, varios estudios han demostrado que los O_2^- pueden actuar como vasoconstrictores (Cosentino *et al.*, 1994 y Auch-Schwelk *et al.*, 1989) y estimulantes de la proliferación celular por sus efectos mitogénicos directos sobre las CMLV (Gong *et al.*, 1996; Rao y Berk, 1992).

Otro mecanismo que puede estar involucrado en la disfunción endotelial en SHR es el aumento de la producción de un factor endotelial constrictor (EDCF, *Endothelium-Derived Contracting Factor*). Las primeras contracciones asociadas a disfunción endotelial fueron observadas en aorta aislada de ratas SHR (Félétou y Vanhoutte, 2006; Lüscher y Vanhoutte, 1986). Estas contracciones se han relacionado con la severidad de la hipertensión. Las contracciones dependientes de endotelio y la disfunción endotelial son menos severas en ratas hembras SHR (Graham y Rush, 2009; Kauser y Rubanyi, 1995).

Las respuestas dependientes de endotelio están asociadas con un incremento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). De hecho, la acetilcolina provoca un incremento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales de SHR y en menor intensidad en WKY. En contra, el ionóforo de calcio, A23187, el cual permite la entrada de calcio del espacio extracelular dentro de las células, provoca un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ similar en las células endoteliales de SHR y WKY. La acetilcolina y en general las contracciones dependientes de endotelio mediadas por receptor son mayores en SHR que en WKY, en cambio la amplitud máxima de esas contracciones a través de A23187 son iguales en ambas cepas (Gluais *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2004). Estos resultados ilustran la primera disfunción endotelial asociada con contracciones dependientes de endotelio, por ejemplo, una señal de calcio anormal en las células endoteliales de SHR en respuesta a agentes neurohumorales.

La fosfolipasa A_2 (PLA₂, *PhosphoLipase A₂*) cataliza la ruptura de fosfolípidos de membrana a ácido araquidónico. Se han descrito dos tipos de PLA₂ citosólicas, una dependiente de calcio (cPLA₂, *calcium-dependent PLA₂*) y otra independiente de calcio (iPLA₂, *independent-calcium PLA₂*). El incremento de $[Ca^{2+}]_i$, independientemente del estímulo, activa la cPLA₂, y provoca la movilización de ácido araquidónico. Sin embargo, en respuesta a acetilcolina, iPLA₂ está involucrada en la producción de lisofosfolípidos, que abren canales operados por almacenamiento de calcio, permitiendo la entrada de calcio extracelular y la subsiguiente activación de cPLA₂. En contra, el ionóforo de calcio, independientemente de los receptores de membrana, incrementa el calcio endotelial y activa de forma directa a la cPLA₂ (Wong *et al.*, 2010).

El siguiente paso es la activación de ciclooxigenasa y la producción de especies reactivas de oxígeno y finalmente la activación de los receptores TP (Ge *et al.*, 1995; Gluais *et al.*, 2005; Gluais *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). En aortas de SHR, la COX-1 es la principal enzima involucrada en la generación de EDCFs, ya que las contracciones dependientes de endotelio son bloqueadas por inhibidores específicos de COX-1 y se ven

mínimamente afectadas por inhibidores selectivos de COX-2 (Ge *et al.*, 1995; Gluais *et al.*, 2005; Gluais *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007). De hecho, las células endoteliales de aorta de distintas especies expresan preferentemente COX-1 versus COX-2 (Kawka *et al.*, 2007; Onodera *et al.*, 2000).

Sin embargo, tanto en células endoteliales de WKY como de SHR, la inducción de COX-2, especialmente en arterias de resistencia y en el envejecimiento, también se asocia con la producción de prostanoides. En estas arterias, COX-2 contribuye a la disfunción endotelial (Alvarez *et al.*, 2005; Blanco-Rivero, 2005; García-Cohen *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2008).

Los EDCFs difunden hacia las células de músculo liso vascular y directamente activan a los receptores TP (Yang *et al.*, 2003). La inhibición de la síntesis de TXA₂ no afecta a las contracciones inducidas por acetilcolina, pero sí se inhiben parcialmente las contracciones en respuesta a A23187, ADP o endotelina-1; indicando que TXA₂ es uno más de los EDCFs que pueden ser liberados de células endoteliales de aorta de ratas SHR (Ge *et al.*, 1995; Gluais *et al.*, 2005; Gluais *et al.*, 2007; Taddei y Vanhoutte, 1993). PGH₂ es el segundo agonista más potente de receptores TP y es más efectivo en activar receptores de músculo liso de SHR que de WKY. Por tanto, PGH₂ es también un adecuado candidato como EDCF. Sin embargo, en células endoteliales de aorta de SHR la expresión aumentada de prostaciclín sintetasa (Tang y Vanhoutte, 2008; Vera *et al.*, 2005) y su estrecha asociación con COX-1 (Kawka *et al.*, 2007) no están a favor de un incremento masivo de PGH₂. Paradójicamente, la prostaciclina es probablemente un gran EDCF. En una temprana y específica disfunción de los receptores IP del músculo liso vascular, la prostaciclina no relaja sino que provoca un efecto contractor dependiente de receptores TP (Gluais *et al.*, 2005; Rapoport y Williams, 1996). Por tanto, la disfunción asociada a contracciones dependientes de endotelio puede deberse a cambios en las respuestas de los receptores IP y TP del músculo liso vascular sin que existan grandes cambios en su expresión (Numaguchi *et al.*, 1999; Suzuki y Ford, 1992).

Finalmente, PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ pueden también actuar como EDCFs, cuando la prostaciclín sintetasa está inhibida y el metabolismo de PGH_2 desviado, un fenómeno que se puede dar cuando el estrés oxidativo severo provoque la nitración de tirosina de la prostaciclín sintetasa (Zou *et al.*, 2002).

3. Hipertensión DOCA-sal o hipertensión Volumen dependiente.

3.1. Generalidades de la hipertensión DOCA-sal.

A pesar de la incidencia relativamente baja de una hipertensión humana secundaria a la hipersecreción de 11-deoxicorticosterona (DOC), la investigación de uno de los intermediarios en la biosíntesis de corticosteroides y de su derivado acetilado (DOCA) tiene un lugar prominente en el estudio de la hipertensión experimental.

DOC y DOCA, fueron los primeros corticosteroides sintéticos que se obtuvieron a grandes cantidades y fueron usados en numerosos estudios farmacológicos a finales de los años treinta.

No es sorprendente que los primeros estudios clínicos sobre este tipo de hipertensión se realizaran en pacientes con enfermedad de Addison. Loeb y colaboradores (1939) describieron dos casos en los que la hipertensión era provocada por el tratamiento con DOCA, lo cual fue confirmado por otros autores (Thorn *et al.*, 1942). Los estudios se iniciaron en aquel laboratorio debido a que se encontró un número significativo de pacientes con enfermedad de Addison que desarrollaban insuficiencia cardíaca, Kuhlmann y colaboradores (1939) describieron que el tratamiento con DOCA en perros inducía hipertensión, lo cual fue confirmado después por Swingle y colaboradores (1941). En 1940, Grollman y colaboradores pusieron de manifiesto que el tratamiento con DOCA en ratas aumentaba su presión arterial, sus experimentos mostraban una clara

implicación del riñón en la patogénesis de este tipo de hipertensión. Pero sus estudios también demostraban que la inyección de DOCA *per se* a las ratas no producía hipertensión. Selye y colaboradores (1943) fueron los primeros en demostrar que tanto la nefroesclerosis como la hipertensión eran resultado de un tratamiento con DOCA y sal, hecho puesto de manifiesto en distintas especies animales como ratas, perros y monos (Selye y Hall, 1943). Aquel grupo se embarcó en un estudio para relacionar el potencial de cada esteroide para causar hialinosis y nefroesclerosis (Selye, 1970). Establecieron la relación entre la actividad mineralocorticoide y su habilidad para producir daño renal e hipertensión, definiendo la hipertensión mineralocorticoide. Así pues, la hipertensión DOCA-sal en la rata es el modelo animal de hipertensión mineralocorticoide mejor conocido. En este modelo la hipertensión es inducida por la inyección repetida de DOCA o por implantación subcutánea de dicho compuesto, que se va liberando de forma continuada. Selye y Hall (1944) encontraron que las ratas eran más resistentes a una sobredosificación de DOCA que otras especies estudiadas. El procedimiento desarrollado para superar esta resistencia en estos animales de experimentación precisa realizar una uninefrectomía (Hall y Hall, 1969), probablemente porque de este modo aumenta el efecto de retención renal de Na^+ inducido por DOCA.

También se requiere el uso de NaCl en el agua de bebida (Selye *et al.*, 1943). Aunque este suplemento de NaCl en el agua de bebida de las ratas tratadas con DOCA va a influir más en la inducción de hipertrofia renal y cardíaca que en la presión arterial (Green *et al.*, 1948).

3.2. Patogénesis de la hipertensión DOCA-sal.

Recientemente, varios investigadores han propuesto que la hipertensión DOCA-sal en ratas se desarrolla en distintas etapas; con un incremento brusco de la presión arterial en las primeras 48 horas seguido por una disminución,

desarrollándose un ascenso lento de la presión en las siguientes semanas hasta que la hipertensión se hace sostenida (Jacob *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2006). Otros autores han descrito una fase más tardía, denominada como maligna, donde una hipertensión severa es observada a las 8-12 semanas. Uno de los factores que contribuyen a la instauración de la hipertensión puede ser la retención de Na^+ y agua. Otro factor que debe ser tenido en cuenta en este modelo experimental es la ausencia de sustancias antihipertensivas producidas por el riñón, tales como prostaglandinas o lípidos neutros. El contenido de renina en plasma y en tejido renal es menor en los animales tratados con DOCA, probablemente como consecuencia de la expansión de volumen del fluido extracelular. Así pues, el sistema renina-angiotensina (SRA) no va a participar en la patogénesis de la hipertensión inducida por DOCA.

Existen ciertas evidencias del papel de factores neuronales y no neuronales durante el inicio, desarrollo y fase maligna de la hipertensión (Yemane *et al.*, 2009).

Componentes neuronales

1. Actividad del Sistema Nervioso Simpático

Existen evidencias indirectas de que el aumento de la actividad simpática juega un papel crucial en el desarrollo de la hipertensión DOCA-sal, al igual que se ha sugerido en otros modelos de hipertensión animal. Las catecolaminas plasmáticas se encuentran elevadas durante la etapa de desarrollo (2-6 semanas) en ratas hipertensas DOCA-sal (Reid *et al.*, 1975; Bouvier y de Champlain, 1986). El bloqueo ganglionar provoca una mayor disminución de la presión arterial en las fases de inicio y desarrollo de la hipertensión (Takeda y Bunag, 1980; Fink *et al.*, 2000). Además, el bloqueo periférico simpático previene la hipertensión inducida por DOCA-sal y el incremento en plasma de noradrenalina (Reid *et al.*, 1975).

O'Donoghuy y Brooks (2006) estudiaron que una disminución aguda en los niveles plasmáticos de NaCl durante la primera fase disminuyó la actividad

simpática a nivel lumbar y la presión arterial en animales DOCA-sal. Estos autores proponen que los niveles de NaCl o bien la osmolaridad plasmática provocan la excitación del simpático conduciendo a hipertensión. Abrams y Osborn (2008) describen que la hipertensión DOCA-sal podría ser atenuada por la administración a nivel central de benzamil, un antagonista selectivo del canal epitelial de sodio.

2. Nervios renales

Se ha propuesto que la activación simpática a nivel renal contribuye al desarrollo de la hipertensión DOCA-sal, ya que la denervación renal disminuye el inicio y atenúa la severidad de la hipertensión (Katholi *et al.*, 1980). Jacob y colaboradores (2005) estudiaron que la denervación renal atenuaba el incremento de la presión arterial media durante la fase de desarrollo de la hipertensión (2-6 semanas). En contra, otros autores han descrito que la denervación renal no altera el desarrollo de la hipertensión DOCA-sal (Brody y Johnson, 1980; Dzielak y Norman, 1985). La denervación renal destruye nervios aferentes renales que podría estar involucrados en el desarrollo de la hipertensión.

Jacob y colaboradores (2005) sugieren que las fibras aferentes participan en la hipertensión ya que la ingesta de sodio. Las fibras aferentes renales atraviesan las raíces dorsales de los nervios espinales T10-L1 (Knuepfer *et al.*, 1988). Kopp y colaboradores (2008) describen que el deterioro del control baroreflejo arterial incrementa la actividad simpática de fibras eferentes en ratas rizotomizadas a nivel dorsal y alimentadas con una dieta rica en sodio. Yemane y colaboradores (2009) concluyen que el papel de las fibras eferentes y aferentes no está resuelto, en parte, debido a que no existen herramientas experimentales adecuadas para la denervación selectiva de nervios renales eferentes a aferentes.

Componentes no neuronales

3. Vasopresina

Existen evidencias considerables para sugerir que la patogénesis de la hipertensión DOCA-sal es dependiente de mecanismos no neuronales. El tratamiento DOCA-sal incrementa la liberación de vasopresina y la respuesta vascular (Yamamoto *et al.*, 1984). En ratas deficientes de vasopresina, la hipertensión DOCA-sal fue atenuada y el incremento en el volumen del fluido extracelular fue prevenido a pesar del incremento de los niveles extracelulares de sodio (Zicha *et al.*, 1989). El papel de la vasopresina podría deberse a una acción dual como agente antidiurético y presor o bien a su capacidad para liberar endotelina.

4. Endotelina

La ET-1 juega un papel fundamental en la patogénesis de la hipertensión DOCA-sal, en contraste con otros modelos en los que estos niveles no están modificados, como es el caso del modelo SHR (Lariviere *et al.*, 1993). Este péptido de 21 aminoácidos produce una respuesta inflamatoria por aumento del estrés oxidativo a nivel de la pared vascular, lo cual conduce a un remodelado vascular y a disfunción endotelial, y los antagonistas de receptores de ET-1 reducen el aumento de la presión arterial y la hipertrofia vascular presente en estos modelos experimentales de hipertensión, así como en pacientes hipertensos (Schiffrin, 2005).

Li y colaboradores (2003a) describen que tanto los niveles de ET-1 como de superóxido están incrementados en arterias carótidas de ratas DOCA-sal, sugiriéndose que ET-1 aumenta la producción de superóxido vía receptor de ET_A-NADPH oxidasa en hipertensión mineralcorticoide.

El bosentan, un antagonista de ET-1, reduce la presión arterial de ratas DOCA-sal, y esta reducción se vio aumentada por un antagonista de vasopresina (Yu *et al.*, 2001a). Estos autores describen que un antagonista de vasopresina sólo reduce la presión arterial cuando se administra conjuntamente con un antagonista de ET-1 (Yu *et al.*, 2001a). Otros autores demuestran que la vasopresina estimula la producción de ET-1 a nivel arterial, resultando en un incremento de los niveles de superóxido en hipertensión DOCA-sal (Li *et al.*, 2003ab). Estos resultados sugieren que la liberación de ET-1 inducida por vasopresina podría ser, en parte, el responsable de la evolución de la hipertensión DOCA-sal.

Otros factores como el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP, *Calcitonin Gene-Related Peptide*) y compuestos digitálicos han sido también implicados como causas de la hipertensión DOCA-sal (Van Huysse, 2007).

3.3. Alteraciones anatomopatológicas de la hipertensión DOCA-sal.

La hipertensión experimental va habitualmente acompañada de lesiones renales. El tipo de afectación varía según el modelo de hipertensión, sin embargo, en general, se producen cambios a nivel glomerular, tubular e intersticial. Dworkin y colaboradores (1984) estudiaron la morfología renal en ratas uninefrectomizadas y con hipertensión inducida por la administración de DOCA-sal durante tres semanas, tras las cuales observaron un aumento difuso de la matriz mesangial así como áreas focales de trombosis y hemorragia intraglomerular. Además, ya antes de la aparición de las alteraciones histológicas estos animales mostraron alteraciones en la hemodinámica renal y proteinuria, precediendo a las alteraciones estructurales.

Estos autores analizaron también el efecto del contenido proteico de la dieta sobre la progresión de la insuficiencia renal, observando que cuando las ratas uninefrectomizadas eran sometidas a una dieta hiperproteica se aceleraba la

aparición de esclerosis glomerular. Estudios realizados en ratas con 90 % de ablación de masa renal demuestran que la restricción proteica ayuda a preservar la arquitectura del glomérulo y disminuye la proteinuria (Hostetter *et al.*, 1981). En humanos, los estudios realizados también sugieren un retraso en la progresión de la insuficiencia renal con la restricción proteica (Maschio *et al.*, 1982). Es probable que el efecto renoprotector de la restricción proteica en las ratas DOCA-sal se base en sus efectos sobre la hemodinámica renal, pero lo que sí está claro es que no se relaciona con alteraciones en el balance de Na^+ ni de K^+ .

Se ha descrito la presencia de atrofia del epitelio tubular, hipertrofia de la membrana basal y formación de cilindros hialinos en ratas con hipertensión DOCA-sal (Kim *et al.*, 1994). En el glomérulo se observa necrosis fibrinoide y atrofia de los capilares del ovillo glomerular. A nivel vascular las arteriolas muestran una hipertrofia prominente y necrosis fibrinoide. Asimismo, en el intersticio es patente una importante fibrosis.

El daño renal en este modelo resulta evidente por la proteinuria y los cambios morfológicos. Hay estudios que investigan el tratamiento y la prevención del daño renal como el que llevaron a cabo Seifi y colaboradores (2009). Vieron el efecto de una terapia antioxidante sobre el daño renal en el modelo DOCA-sal. Administraron vitamina C y/o vitamina E a dosis de 200 mg/Kg/día, con lo que disminuyeron los niveles de proteínas en orina y mejoró la histopatología renal. La coadministración de estas vitaminas no tuvo un efecto mayor que la administración de éstas por separado, pero queda clara la implicación del estrés oxidativo en el desarrollo del daño renal en este modelo de hipertensión. En otro estudio muy reciente de Bae y colaboradores (2010), diseñado para evaluar los posibles efectos renoprotectores de la rosiglitazona (agonista PPAR γ) en la hipertensión DOCA-sal y su papel en la producción de ET-1 y la fibrosis renal asociada a la inflamación, se ha observado que el tratamiento con rosiglitazona disminuye la presión arterial y es efectivo en la prevención de la progresión del daño renal en la hipertensión DOCA-sal. Estos efectos antiinflamatorios y

antifibróticos están asociados con la reducción en la sobreexpresión de ET-1 y COX-2 entre otros factores.

3.4. Reactividad vascular en la hipertensión DOCA-sal.

Se conoce hace años que hay una menor respuesta a Ach en aortas de ratas con hipertensión DOCA-sal, así como en microvasos de la zona mesentérica, que se ha relacionado con un incremento en la producción de factores contractores derivados de endotelio (FCDE) y que es sensible a inhibidores de la COX (Cordellini *et al.*, 1990 y Katusic y Shepherd, 1991). El deterioro de la relajación dependiente de endotelio en la hipertensión está íntimamente relacionado con el grado de hipertensión alcanzado y puede ser recuperado tras el tratamiento con fármacos antihipertensivos como se ha visto en varios modelos de hipertensión genética (Lüscher *et al.*, 1987 y Nigro *et al.*, 1989).

Otro estudio de Cordellini (1999), corrobora el hecho de que la respuesta a Ach en aortas de ratas con hipertensión DOCA-sal está disminuida y también lo atribuye a una mayor producción de FCDE, postulando que el efecto podría ser debido a un producto del metabolismo del ácido araquidónico. Para comprobar esta hipótesis evalúa la respuesta endotelio-dependiente a Ach en aortas de ratas DOCA-sal, en presencia de diferentes inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico, algunos de los cuales, como el piroxicam, fueron capaces de restablecer la respuesta a Ach hasta valores normales.

Nunes y colaboradores (2000) realizaron curvas concentración-respuesta al donador de NO, NPS, en aortas de ratas con hipertensión DOCA-sal. La relajación causada por esta molécula fue similar en los anillos de las ratas hipertensas a las de sus controles normotensos, sin observarse diferencias en presencia o ausencia de endotelio. Este hecho reafirma una posible disfunción endotelial en este modelo de hipertensión. Hay tratamientos en los que se ha comparado la acción antihipertensiva del tempol con la triple terapia (reserpina,

hidralazina e hidroclorotiazida) (Nakano *et al.*, 2003) se observó como la triple terapia mostró un potente efecto en disminuir la presión arterial, pero fracasó a la hora de suprimir el incremento en la producción vascular de $O_2^{\cdot-}$, mientras que un análogo permeable de la SOD fue capaz de suprimirlo. En ambos casos se observó una mejora significativa en la respuesta a Ach en aorta, lo que sugiere que la mejora de la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal resulta de la disminución en la presión arterial y no tanto por la normalización en la producción de radicales $O_2^{\cdot-}$. Bockman y colaboradores (1992) describieron el papel protector que ejerce el endotelio en arterias de resistencia, como la mesentérica, de ratas DOCA-sal. Cuando el endotelio era eliminado mecánicamente de la arteria, la respuesta contráctil a diversos agentes como el KCl o la arginina vasopresina era similar en animales hipertensos y normotensos. En cambio, cuando se conservaba el endotelio del vaso, la hipertensión DOCA-sal producía un incremento significativo de la sensibilidad del vaso a estos mismos agentes contractores. Por esta razón estos autores concluyeron que el endotelio actúa como protector de este incremento de la respuesta contráctil.

En 2004, en este laboratorio, Galisteo y colaboradores (2004) analizaron los efectos de la administración crónica de una dosis oral diaria de quercetina (10 mg/Kg) sobre la función endotelial y la presión arterial y la compararon con los efectos del bloqueante de canales de calcio verapamilo (20 mg/Kg). Ambos compuestos previnieron el incremento de presión arterial. Se vio que la relajación dependiente de endotelio a Ach estaba disminuida en anillos intactos de ratas DOCA-sal. La incubación de estos anillos con una mezcla antioxidante de SOD y catalasa mejoró pero no restableció por completo dicha relajación (indicando posibles alteraciones en el proceso de biosíntesis de NO). El tratamiento crónico con quercetina normalizó la función endotelial, y no se observaron diferencias en presencia o ausencia de la mezcla antioxidante. La administración crónica de verapamilo no tuvo efecto sobre la disfunción endotelial y sólo en presencia de SOD y catalasa se mejoró la relajación a Ach. Zhao y colaboradores (2000) analizaron la respuesta a ET-1 en microvasos de ratas DOCA-sal en un estudio

diseñado para determinar el papel de la ET-1 en la resistencia periférica elevada de estas ratas. La sensibilidad de los microvasos a ET-1 estaba disminuida en ratas DOCA-sal. Esto se debía, probablemente, a la elevada concentración de ET-1 a lo largo del desarrollo de la hipertensión, con la consiguiente regulación a la baja de sus receptores.

3.5. Estrés oxidativo e hipertensión DOCA-sal.

Varios autores han observado incrementos en varios marcadores de daño oxidativo en diferentes tejidos en varios modelos experimentales de hipertensión arterial. Estos efectos lesivos se deben a alteraciones en la producción de O_2^- , en la biodisponibilidad del NO y a cambios en la actividad NADPH oxidasa y de enzimas antioxidantes (Cediel *et al.*, 2003; Gomez-Amores *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 1992; Kitts *et al.*, 1998; Kumar y Das, 1993; Pedro-Botet *et al.*, 2000; Ulker *et al.*, 2003 y Zhan *et al.*, 2004). En el mismo estudio, ya mencionado en el apartado anterior, de Galisteo y colaboradores (2004) analizaron los efectos de la administración crónica del flavonoide quercetina y del verapamilo en la hipertensión y el estado oxidativo de ratas DOCA-sal en diferentes tejidos. En este estudio, el tratamiento DOCA-sal produjo una disminución significativa de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas, como la Glutation Peroxidasa (GPX) y la Glutation S-Transferasa (GST). La producción de TBARS también se encontraba incrementada en el hígado y el corazón de las ratas DOCA-sal. Esta disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes es correlativa al incremento de la producción de TBARS, siendo en una proporción similar. En cambio, se detectó un aumento en el contenido de Glutation total (GSH) hepático, lo que está considerado por algunos autores como un mecanismo de adaptación para la defensa frente a una formación incrementada de radicales libres (Toth *et al.*, 1986). No se detectaron cambios en la actividad de la Glutation Reductasa en hígado en las ratas DOCA-sal, pero se observó una disminuida

actividad renal de la GST, lo que sugiere una menor tasa de reacciones de detoxificación, dejando a los riñones más expuestos a sufrir daños. La quercetina fue capaz de incrementar los sistemas de defensa antioxidantes en hígado, corazón y riñón. Consecuentemente, el estrés oxidativo está directamente relacionado con el desarrollo de la hipertensión en este modelo experimental, de hecho en un estudio de los autores Nicod y colaboradores (2000), se postuló el uso de antioxidantes, en concreto el ácido clofíbrico y el dietilmaleato, como coadyuvante a la terapia antihipertensiva. En el grupo de ratas hipertensas tratadas con los agentes antioxidantes citados, hubo un incremento en las actividades hepáticas SOD, GPX y CAT, acompañado de una disminución de la presión sanguínea elevada.

Somers y colaboradores (2000) cuantificaron la producción de O_2^- vascular en aortas de ratas DOCA-sal mediante quimioluminiscencia, observando que ésta era significativamente mayor que en ratas normotensas. Hay evidencias de la contribución de la NADPH oxidasa a la producción de O_2^- en el modelo DOCA-sal, modelo de hipertensión dependiente de ET-1 y con bajos niveles de renina (Touyz *et al.*, 2004). Este modelo de hipertensión experimental se caracteriza por el aumento en la expresión de ET-1 en arterias de resistencia (Lariviere *et al.*, 1993) y la elevación de los niveles de O_2^- en la pared vascular (Touyz *et al.*, 2004). Aunque la relación entre los receptores ET_A y ET_B y la NADPH oxidasa ha sido destacada en varios estudios (Amiri *et al.*, 2004), la inhibición de la NADPH oxidasa afectó sólo parcialmente a la generación de O_2^- en ratas DOCA-sal (Berry y Hare, 2004), mientras que el tratamiento con antagonistas para ET_A abolió la generación de O_2^- (Li *et al.*, 2003), lo que sugiere una posible contribución de fuentes adicionales a la NADPH oxidasa como generadoras de O_2^- en este modelo.

Callera y colaboradores (2006) sugieren que el estrés oxidativo inducido por ET-1 en la hipertensión DOCA-sal implica mecanismos independientes de NADPH oxidasa. La xantina oxidasa y la mitocondria son fuentes generadoras de O_2^- y podrían contribuir a la disfunción vascular en la hipertensión, siendo de este

modo candidatos como fuente adicional en la generación de O_2^- en ratas DOCA-sal (Viel *et al.*, 2008).

Justificación y objetivos.

Justificación y objetivos

El PPAR es un factor de transcripción activado por ligando que pertenece a la superfamilia de receptores hormonales nucleares, que regula la transcripción de muchos genes diana. Existen 3 tipos: PPAR α , PPAR γ y PPAR β .

Son muy conocidos sus efectos metabólicos, por ello, los fibratos (agonistas PPAR α) se emplean para el tratamiento de dislipemias, y las tiazolidindionas (agonistas PPAR γ) para el tratamiento de diabetes tipo 2.

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 (Morales *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 humanos y modelos animales con o sin trastornos metabólicos (Raji *et al.*, 2003; Füllert *et al.*, 2002; Schiffrin, 2005; Diep *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque el subtipo β sea el PPAR más ampliamente expresado en los tejidos humanos, su papel fisiológico y fisiopatológico es menos conocido.

Este receptor 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).

Al igual que PPAR α y $-\gamma$, 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).

Pero menos aún se conoce acerca de sus acciones cardiovasculares. Se ha demostrado que la activación de PPAR β mejora la hipertrofia cardíaca *in vitro* (Sheng *et al.*, 2008), protege a las HUVEC de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (Jiang *et al.*, 2009) e inhibe la proliferación y migración de las CMLV (Lim *et al.*, 2009), pero, paradójicamente, induce la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis (Piqueras *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008).

Recientemente, se han descrito efectos no genómicos de estos receptores (Burgermeister y Seger, 2007; Cheskis *et al.*, 2007; Stahn y Buttgerit, 2008). Agonistas PPAR β inhiben la proliferación y migración de CMLV en ratas (Han *et al.*, 2008) e inhiben la agregación y la activación plaquetaria (Ali *et al.*, 2006) a través de efectos no genómicos. En el presente estudio se plantea la **hipótesis** de que los agonistas PPAR β podrían ejercer efectos no genómicos y modificar el tono vascular.

Debido al papel terapéutico prometedor de los agonistas PPAR β y a la relativa falta de conocimiento de las acciones de los PPAR β en el territorio vascular, en este estudio se investigaron los efectos a corto plazo del L165041, agonista potente y de baja selectividad de PPAR β (Willson *et al.*, 2000), y del GW0742, agonista selectivo y potente de PPAR β (Kim *et al.*, 2006).

Por todo ello, **el primer objetivo de esta Tesis Doctoral** es analizar los efectos de agonistas PPAR β sobre el tono vascular en anillos aórticos aislados de rata, centrándonos en el papel del endotelio y del óxido nítrico (NO), y sus

efectos sobre la expresión y la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en HUVECs.

La hipertensión es un factor de riesgo para el desarrollo y la aceleración de la aterosclerosis. El estrés oxidativo y la inactivación del NO por el O_2^- juegan un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad vascular, como la hipertensión (Takata *et al.*, 2008).

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 la fosfato dinucleótido nicotinamida-adenina (NADPH) oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como el aumento de mediadores proinflamatorios y moléculas de adhesión en los vasos sanguíneos.

La activación de PPAR β también exhibe propiedades antiinflamatorias en la pared vascular por la inhibición expresión de VCAM-1 y MCP-1 (Rival *et al.*, 2002). Por otra parte, la administración oral del agonista PPAR β , GW0742, reduce la aterosclerosis en ratones knockout de LDLR^{-/-} (Graham *et al.*, 2005) y atenúa la aterosclerosis acelerada por Ang II y la inflamación arterial y expresión de genes aterogénicos (Takata *et al.*, 2008). Agonistas PPAR β también inducen efectos vasodilatadores en aortas aisladas y arterias mesentéricas y pulmonares (Jiménez *et al.*, 2010; Harrington *et al.*, 2010). Además, agonistas PPAR β reducen la hipertrofia cardíaca y la presión sistólica ventricular en un modelo experimental de hipertensión arterial pulmonar inducida por hipoxia crónica (Harrington *et al.*, 2010). Estos datos nos permiten **hipotetizar** que los agonistas de PPAR β podrían tener efectos antihipertensores en animales con hipertensión genética en los que en su génesis estuviera involucrado el sistema renina-angiotensina.

Todo ello justifica el **segundo objetivo de esta Tesis Doctoral**: estudiar los efectos del tratamiento crónico con el agonista PPAR β GW0742 sobre la presión arterial, la función endotelial y la inflamación vascular en ratas espontáneamente hipertensas, donde hay una gran participación de la vía de la Ang II.

Los niveles arteriales de O $_2^-$ se encuentran elevados en los modelos de hipertensión dependientes de renina, lo que se atribuye en gran medida a la activación de la NADPH oxidasa mediada por Ang II (Graham *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2007). Sin embargo, un exceso de la producción de O $_2^-$ vascular también se ha encontrado en el modelo de hipertensión arterial DOCA-sal (Wu *et al.*, 2001; Beswick *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2007), donde la actividad de la renina plasmática está disminuida debido a la retención de sodio (Gravras *et al.*, 1975). Los pacientes con bajos niveles de renina (por ejemplo, en la hipertensión sensible a sal) representan aproximadamente el 30% de los hipertensos esenciales y muestran una mala respuesta terapéutica a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los bloqueantes de los receptores de la angiotensina.

Se ha demostrado que la ET-1 contribuye a la patogénesis de la hipertensión sensible a sal, secundaria a un estado bajo de renina, tanto en animales como en humanos (Letizia *et al.*, 1997; Eljovich *et al.*, 2001). ET-1 es el vasoconstrictor más potente producido en la pared vascular y también aumenta la producción vascular de O $_2^-$, al menos en parte, a través de la vía ET $_A$ /NADPH oxidasa (Li *et al.*, 2003) que conducen a disfunción endotelial y a hipertensión arterial.

Agonistas PPAR α y PPAR γ previenen la hipertensión, la fibrosis cardíaca, el remodelado vascular, la disfunción endotelial y el daño renal en ratas DOCA-sal (Iglarz *et al.*, 2003a, b; Ogata *et al.*, 2004; Newaz *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2010). Estos efectos protectores parecen estar asociados

con una disminución de la producción de ET-1 (Iglarz *et al.*, 2003a, b; Newaz *et al.*, 2005; Bae *et al.*, 2010), mediante la inhibición de la señalización de la vía AP-1 (Delerive *et al.*, 1999; Nizard Martin *et al.*, 2002). Recientemente, se ha encontrado que los ligandos PPAR α y PPAR γ también inhiben la vía ET-1 para inducir efectos vasculares proinflamatorios (Montezano *et al.*, 2007) e hipertrofia cardíaca (Irukayama-Tomobe *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011).

Los datos iniciales de esta Tesis Doctoral indicaban que GW0742 disminuye la presión arterial, mejora la disfunción endotelial y reduce el estado vascular proinflamatorio y proaterogénico en SHR por la actuación sobre la vía de señalización de la Ang II, lo que sugiere que sería poco eficaz como antihipertesor en los modelos de hipertensión independientes de renina. Sin embargo, la activación PPAR β también inhibe de la vía de señalización de AP-1 (Kaddatz *et al.*, 2010; Meisner *et al.*, 2011), que podría reducir la síntesis de ET-1 y las alteraciones cardiovasculares mediadas por este agente proliferativo y vasoconstrictor. Sin embargo, no hay información acerca de los efectos de los ligandos PPAR β en la producción de ET-1 y la vía de ET-1 en el sistema vascular. Por ello planteamos la **hipótesis** de que el GW0742 al activar PPAR β reduciría la síntesis de ET-1 y permitiría prevenir las alteraciones cardiovasculares en el modelo DOCA-sal.

Por lo tanto, el **tercer objetivo propuesto en esta Tesis Doctoral es:** evaluar si el tratamiento crónico con GW0742 previene el desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial en el modelo DOCA-sal y, determinar los mecanismos subyacentes, centrándonos sobre todo en la participación de ET-1 y de estrés oxidativo.

Justification and aims.

Justifications and aims

PPARs are ligand-activated transcription receptors that belong to the nuclear hormone receptor superfamily, which regulate the transcription of diverse genes (Kota *et al.*, 2005). There are three known PPAR subtypes: α , β (also referred to as δ), and γ .

Their metabolic effects are well known, therefore, fibrates (PPAR α agonists) are used to treat dyslipidemia, and thiazolidinediones (PPAR γ agonitas) for the treatment of type 2 diabetes mellitus.

Initially it was believed that PPARs regulate genes involved only in carbohydrate and lipid metabolism (Marx *et al.*, 2004). In recent years, it is suggested that activation of PPAR α and PPAR γ can exert cardiovascular protection beyond its metabolic effects (Leibovitz *et al.*, 2007). The results show a favorable cardiovascular profile due to its antiatherosclerotic, anti-inflammatory and vasodilatory effects (Schiffrin *et al.*, 2003), and its ability to inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and endothelial cells (Lee *et al.*, 2006; Benkirane *et al.*, 2006), to reduce cardiac hypertrophy (Asakawa *et al.*, 2002), to inhibit platelet aggregation (Morales *et al.*, 2007) and to lower blood pressure (Khan *et al.*, 2005 ; Iglarz *et al.*, 2003). PPAR α and PPAR γ agonists exert antihypertensive effects in humans and animal models with or without metabolic disorders (Raji *et al.*, 2003; Füllert *et al.*, 2002, Schiffrin, 2005; Diep *et al.*, 2002).

Despite PPAR β is the most widely expressed PPAR receptor in body tissues, its physiological and pathophysiological role is less known. It has been implied in adipose tissue formation (Vosper *et al.*, 2001), brain development (Cimini *et al.*, 2005), cell proliferation (Piqueras *et al.*, 2007), placental function (Barak *et al.*, 2002) and inflammation (Lee *et al.*, 2003).

Beyond their metabolic effects on blood glucose and lipids, they show a favourable cardiovascular profile due to their well known antiatherosclerotic, anti-inflammatory and vasodilator effects (Schiffrin *et al.*, 2003), and their abilities to inhibit endothelial and VSMC proliferation (Lee *et al.*, 2006; Benkirane *et al.*, 2006), to reduce cardiac hypertrophy

(Asakawa *et al.*, 2002), to inhibit platelet aggregation (Moraes *et al.*, 2007) and to decrease blood pressure (Khan *et al.*, 2005; Iglarz *et al.*, 2003). PPAR- β ligands have been more recently developed and are currently in clinical trials for the treatment of dyslipidemia (Risérus *et al.*, 2008; Barish *et al.*, 2006). However, less is known about other non-metabolic effects of these drugs. So far, it has been demonstrated that PPAR β activation improves cardiac hypertrophy *in vitro* (Sheng *et al.*, 2008), protects human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) from hydrogen peroxide-induced apoptosis (Jiang *et al.*, 2009) and inhibits VSMC proliferation and migration (Lim *et al.*, 2009) but, paradoxically, it induces endothelial cell proliferation and angiogenesis (Piqueras *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008). Recently, multiple non-genomic effects have been reported for agonists of different nuclear receptors (Burgermeister and Seger, 2007; Cheskis *et al.*, 2007; Stahn and Buttgerit, 2008). Thus, PPAR γ ligands inhibit NF- κ B (Chen *et al.*, 2003) or RXR ligands exert antiagregant effects (Moraes *et al.*, 2007). PPAR β agonists also inhibit proliferation and migration of rat VSMC (Han *et al.*, 2008) and inhibit platelet aggregation and activation (Ali *et al.*, 2006) via non genomic effects.

We hypothesized that PPAR β agonists could exert vasorelaxant effects via non genomic mechanisms. Due to the promising therapeutic role of PPAR β agonists and the relative lack of knowledge of the actions of PPAR β in the vascular territory, in this study we investigated the short-term effects of [4-[3-(4-Acetyl-3-hydroxy-2 propylphenoxy) propoxy]phenoxy]acetic acid (L165041), a weak nonselective PPAR β agonist (Willson *et al.*, 2000), and 4-[[[2-[3-Fluoro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-methyl-5 -thiazolyl]methyl]thio]-2-methylphenoxy]acetic acid (GW0742), a selective PPAR β agonist (Kim *et al.*, 2006).

Therefore, the first aim of this Doctoral Thesis is analyze the effects of PPAR β agonists on vascular tone in isolated rat aortic rings and focusing on the role of the endothelium and nitric oxide (NO), and its effects on the expression and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in HUVECs.

Hypertension is a risk factor for the development and acceleration of atherosclerosis. Oxidative stress and NO inactivation by O_2^- play a critical role in the pathogenesis of vascular disease such as hypertension (Takata *et al.*, 2008).

The mechanisms underlying the beneficial effects of PPARs beyond glucose and lipid metabolism may relate to their anti-inflammatory and antioxidant actions (Schiffrin *et al.*, 2005). Thus, activation of both PPAR α or PPAR γ antagonizes angiotensin II (Ang II) actions, including the activation of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and the generation of reactive oxygen species (ROS), as well as the increase in proinflammatory mediators and adhesion molecules in blood vessels (Schiffrin *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2002).

Activation of PPAR β/δ (PPAR β) also exhibits anti-inflammatory properties in the vessel wall by inhibiting the expression of VCAM-1 and MCP-1 (Rival *et al.*, 2002). Moreover, the oral administration of PPAR β agonist, GW0742, substantially attenuated Ang II-accelerated atherosclerosis and the associated arterial inflammatory and atherosclerotic gene expression (Takata *et al.*, 2008). PPAR β agonists also induce vasodilator effects in isolated aorta, mesenteric and pulmonary arteries (Jiménez *et al.*, 2010; Harrington *et al.*, 2010). Furthermore, a PPAR β agonist reduced the right heart hypertrophy and right ventricular systolic pressure in an experimental model of pulmonary arterial hypertension induced by chronic hypoxia (Harrington *et al.*, 2010).

This justifies *the second aims of this Doctoral Thesis*: study the effects of PPAR agonist on blood pressure, endothelial function and vascular inflammation in chronic treatment with GW0742 in spontaneously hypertensive rats, where a large share of the route of the Ang II.

Arterial O_2^- is elevated in Ang II-induced hypertension, attributable to a large extent to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activation by angiotensin II (Ang II) (Graham *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2007). However, an excess of vascular O_2^- production has also been found in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension (Wu *et al.*, 2001; Beswick *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 2007), a model with a markedly depressed plasma renin activity because of sodium retention (Gravras *et al.*, 1975). Patients

with low renin (i.e. salt-sensitive hypertension) represent approximately the 30% of the essential hypertensives and show a poor therapeutic response to angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers. Endothelin-1 (ET-1) has been shown to contribute to the pathogenesis of salt-sensitive hypertension in animals and humans, secondary to a low-renin state (Letizia *et al.*, 1997; Elijevich *et al.*, 2001). ET-1 is the most potent vasoconstrictor produced in the blood vessel wall and also augments vascular O_2^- production, at least in part, via ET_A /NADPH oxidase pathway (Li *et al.*, 2003) leading to endothelial dysfunction and hypertension.

PPAR α and PPAR γ activators prevent hypertension, cardiac fibrosis, vascular hypertrophic remodeling, endothelial dysfunction and renal injury in DOCA-salt rats (Iglarz *et al.*, 2003a, b; Ogata *et al.*, 2004; Newaz *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2010). These protective effects seem to be associated with a decreased ET-1 production (Iglarz *et al.*, 2003a, b;.. Newaz *et al.*, 2005;.. Bae *et al.*, 2010), by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway (Delerive *et al.*, 1999; Nizard Martin *et al.*, 2002). Recently, has been found that PPAR α and PPAR γ ligands also inhibit ET-1 pathway to induce both vascular proinflammatory effects (Montezano *et al.*, 2007) and cardiac hypertrophy (Irukayama-Tomobe *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011).

In this Doctoral Thesis it has observed that GW0742 reduced blood pressure, improved endothelial dysfunction and reduced vascular proinflammatory and proatherogenic status in SHR by interference to angiotensin II signalling pathway (Zarzuelo *et al.*, 2011). PPAR β activation also inhibits AP-1 signaling (Kaddatz *et al.*, 2010; Meisner *et al.*, 2011). However, there are not information about the effects of PPAR β ligands on ET-1 production and ET-1 pathway in vascular system. We hypothesized if *in vivo* GW0742 would affect the development of DOCA-salt hypertension and its vascular features by interfering with ET-1 production and/or signaling.

Therefore, the third aim of this Doctoral Thesis is examine whether chronic intake of GW0742 prevents the DOCA-salt-induced hypertension and endothelial dysfunction and, if so, to determine the underlying mechanism, focusing in the involvement of ET-1 and oxidative stress.

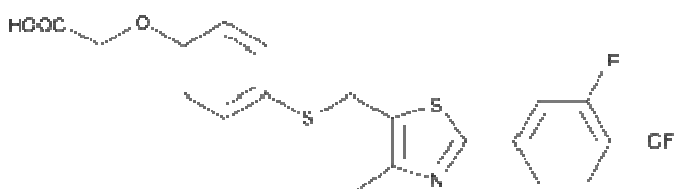
Material y métodos.

Material y métodos.

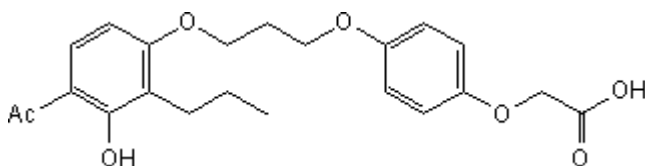
1. Experimento *in vitro*.

1.1. Agonistas PPAR β objeto de estudio.

Para nuestro estudio hemos empleado dos agonistas sintéticos PPAR β 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.

1.2. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200 - 250 gramos obtenidas de Harlam 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.

1.3. Aislamiento e incubación de los anillos aórticos de rata.

Para la realización de los experimentos, las ratas fueron sacrificadas mediante la administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (120 mg/Kg intraperitoneal, i.p.).

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.

1.4. Estudios de reactividad vascular.

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. En algunos experimentos se eliminó el endotelio de los anillos de forma mecánica mediante una ligera fricción de éstos con un alambre de acero inoxidable insertado en el lumen.

La ausencia de endotelio se evaluó mediante la capacidad vasodilatadora dependiente de endotelio de la acetilcolina (ACh) 10⁻⁶ M en anillos aórticos previamente contraídos con fenilefrina (Phe) 10⁻⁷ M.

Para el protocolo experimental en condiciones de cero calcio se utilizó solución de Krebs libre de calcio, en la que CaCl₂ fue omitido y se añadió un agente quelante, ácido etilenglicol-bis (β-aminoetil) N, N, N', N'-tetracético (EGTA) (0,5 mM).

Protocolos experimentales.

1.4.1. Para estudiar el posible efecto vasodilatador, después de equilibrarlos, los anillos con o sin endotelio fueron estimulados por una única concentración de Phe (valorada para producir el 80 % de la respuesta máxima contráctil del agonista

según lo determinado en experimentos preliminares) de modo que se logró un tono similar en todas las condiciones experimentales. Cuando las contracciones se mantuvieron estables, se realizaron curvas relajantes concentración-respuesta mediante la adición acumulativa de los agonistas PPAR β , L165041 ó GW0742 (0,1 - 30 μ M) en intervalos de 15 minutos.

1.4.2. Para analizar la participación del NO endotelial en el efecto vasodilatador, en algunos anillos aórticos con el endotelio intacto, se utilizó el mismo protocolo en presencia del inhibidor de la eNOS, N^G-nitro-L-arginina éster metílico (L-NAME, 100 μ M), añadido 20 minutos antes de la adición de Phe.

1.4.3. Para observar si los agonistas PPAR β aumentaron la sensibilidad de la vía NO-GMPc (guanosín monofosfato cíclico) en el músculo liso vascular, se analizó el respuesta relajante inducida por nitroprusiato de sodio (NPS), donante de NO (10^{-10} - 10^{-6} M), en ausencia o en presencia de GW0742 ó L165041 (10^{-5} M), en anillos aórticos con endotelio intacto, previamente precontraídos con Phe.

1.4.4. Para examinar la participación de Ca²⁺ en la relajación dependiente de endotelio inducida por los agonistas de PPAR β , se realizaron dos protocolos experimentales:

- a) Para analizar el papel de Ca²⁺ extracelular, se incubaron segmentos de aorta intactos en una solución Krebs libre de Ca²⁺ durante 30 minutos antes de la adición de 9,11-didesoxi-11 α , 9 α -F_{2 α} epoximetanoprostaglandina (U46619, 10^{-5} M), un agente vasoconstrictor independiente de Ca²⁺, y luego se realizó una curva concentración-respuesta a L165041 ó GW0742 (0,1 - 30 μ M).

b) Para estudiar el papel del Ca^{2+} intracelular, se analizó la respuesta relajante inducida por estos agentes, en anillos de aorta incubados durante 30 minutos con el quelante de Ca^{2+} intracelular ácido 1,2-bis-(o-aminofenoxi)etano-N, N, N', N'-tetracético acetoximetil éster (BAPTA/AM) (10 μM), después se lavó durante 15 minutos, y se contrajo con U46619 (10 μM) en una solución Krebs libre de Ca^{2+} , para posteriormente realizar la curva concentración-respuesta a L165041 ó GW0742.

1.4.5. Para evaluar la participación de fosfatidil-inositol-3 kinasa (PI3K) en los efectos relajantes de los agonistas PPAR β , se incubaron algunos anillos de aorta con endotelio durante 30 min en solución Krebs junto con el inhibidor de PI3K, 2-(4-morfolinil)-8-fenil-1 (4H)-benzopirano-4-ona clorhidrato (LY-294002, 1 μM). A continuación, los vasos fueron expuestos a Phe (1 μM) y, cuando la respuesta contráctil se mantuvo estable, se construyó una curva concentración-respuesta a L165041 ó GW0742.

1.4.6. Para demostrar si los efectos relajantes estaban relacionados con la activación del receptor PPAR β o PPAR γ , se analizaron los efectos de L165041 y GW0742 en anillos preincubados durante 1h en presencia del antagonista PPAR β , ácido 3-[[[2-metoxi-4-(fenilamino) fenil] sulfonil] amino]-2- éster metílico tiofenocarboxílico (GSK0660, 1 μM) o el antagonista PPAR γ , 2-cloro-5-nitro-N fenilbenzamida (GW9662, 1 μM).

1.5. Fosforilación de proteínas en HUVECs.

1.5.1. 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 min 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 min 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 pretratados con gelatina al 0,2 %.

Fueron caracterizadas por su crecimiento en monocapa y por inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal contra el factor de von Willebrand.

1.5.2. Western blot.

Los experimentos se realizaron en células entre los pases 3 y 5. Para evaluar el grado de fosforilación de eNOS y AKT, a las células se les indujo un estado de no proliferación mediante la privación de factores de crecimiento y heparina durante 24 horas. Las células se incubaron con los agonistas L165041 ó GW0742 (10 μ M) durante 15 minutos. En algunos experimentos las HUVEC fueron incubadas con el inhibidor de PI3K, LY294002 (1 μ M), o con el antagonista de PPAR β , GSK0660 (1 μ M) o con el antagonista de PPAR γ , GW9662 (1 μ M), 30 minutos antes de la adición del agonista PPAR β .

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 blots se realizaron con 30 μ g de proteína. Las proteínas fueron previamente determinadas por el ensayo del ácido bicinonónico (BCA) (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 el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-fosfo-eNOS-ser-1177, monoclonal de ratón anti-eNOS, monoclonal de conejo anti-fosfo-Akt-ser-473 y monoclonal de conejo anti-Akt (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 el resto, 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](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 eNOS y AKT 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.

1.6. La cuantificación del óxido nítrico 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), 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 h antes de la estimulación. Las células se lavaron con PBS y se preincubaron con L-arginina (10^{-4} M en PBS, 5 min, 37 ° C). En algunos experimentos, se añadió L-NAME (10^{-4} M) 15 minutos antes de la adición de L-arginina. Posteriormente, se añadieron DAF-2 (10^{-7} M) y, o bien el ionóforo de calcio calimicina (A23187, 1 μ M) o el agonista PPAR β , L165041 (1, 10 y 30 μ M) o GW0742 (1, 10 y 30 μ M) y las células se incubaron en la oscuridad a 37 ° C. A continuación, la fluorescencia se midió a los 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, la señal de fluorescencia inducida por L165041 ó GW0742 (30 μ M) se midió en HUVECs pretratadas durante 30 minutos con LY294002 (1 μ M), GSK0660 (1 μ M), o GW9662 (1 μ M).

1.7. 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 y conejo-anti-Akt de Cell Signalling Technology, Massachusetts, EE.UU. 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 Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

1.8. 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.

2. Efectos *in vivo* del agonista de PPAR β , GW0742, sobre modelos de hipertensión experimental.

2.1. Animales y grupos experimentales.

2.1.1. Experimento I: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión en ratas SHR.

En el tratamiento *in vivo* con GW0742 utilizamos ratas macho SHR y Wistar Kyoto (WKY) de cinco semanas de edad obtenidas de Harlan Laboratories S.A. (Barcelona, España). Los animales se repartieron de forma randomizada en cuatro grupos:

- a) WKY control (vehículo, 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=20.
- b) WKY tratadas (GW0742, 5 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=20.
- c) SHR control (vehículo, 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=20.
- d) SHR tratadas (GW0742, 5 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=20.

Los fármacos se administraron 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).

El peso corporal se controló semanalmente. El último día de tratamiento los animales se introdujeron en jaulas metabólicas con libre acceso a comida y agua, con el fin de recoger la orina.

Después de cinco semanas de tratamiento y 18 h después de la última administración de GW0742, las ratas fueron anestesiadas con una dosis intraperitoneal de 2,5 mL/Kg de equitensina (500 mL contienen 43 % w/v hidrato de cloral en 81 mL etanol; 4,86 mg nembotal; 198 mL propilen glicol; 10,63 g MgSO₄; agua destilada), y la sangre se extrajo de la aorta abdominal.

2.1.2. Experimento II: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión en ratas DOCA-sal.

Se utilizaron ratas Wistar macho entre 150-180 gramos de peso que se obtuvieron de Harlan Laboratories S.A. (Barcelona, España). Las ratas que iban a

ser asignadas a los grupos DOCA se anestesiaron con una dosis intraperitoneal de 2,5 mL/Kg de equitensina y se uninefrectomizaron. Los animales se dividieron de forma randomizada en cinco grupos:

- a) Control (vehículo, 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=20.
- b) Control tratadas (GW0742, 5 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=20.
- c) DOCA-sal (vehículo, 1mL de metilcelulosa al 1 %), n=18.
- d) DOCA-sal tratado (GW0742, 5 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=19.
- e) DOCA-sal tratado (GW0742, 20 mg/Kg/día en 1 mL de metilcelulosa al 1 %), n=9.

Al día siguiente de la uninefrectomía a los grupos DOCA-sal se les administró, vía intramuscular en la pata trasera, dicho producto a una dosis de 12,5 mg/0,5 mL vehículo/rata por semana (vehículo constituido por una suspensión de aceite de sésamo en etanol absoluto al 20 %), durante 5 semanas. A lo largo del período experimental, las ratas DOCA-sal tenían acceso a agua que contenía NaCl al 1 %.

El peso corporal se controló semanalmente. El último día de tratamiento los animales se introdujeron en jaulas metabólicas con libre acceso a comida y agua, con el fin de recoger la orina.

Después de cinco semanas de tratamiento, las ratas fueron anestesiadas con una dosis intraperitoneal de 2,5 mL/Kg de equitensina, 18 horas después de la última administración de GW0742, y la sangre se extrajo de la aorta abdominal.

2.2 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.

2.3 Parámetros morfológicos.

Al finalizar el período experimental, los animales fueron anestesiados con 2,5 mL/Kg de equitensina (i.p.). 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 alicuyó y se almacenó a - 80 ° C hasta su utilización.

Seguidamente tras la exanguinación de los animales, se extrajeron los riñones, el hígado, la grasa visceral, 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.), Índice de peso de la grasa visceral (I.P.G.) e Índice de peso renal (I.P.R.) de cada animal para su posterior análisis estadístico.

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

2.4. Estudios de reactividad vascular.

Las pruebas se llevaron a cabo en anillos de aorta torácica de las ratas WKY, SHR y DOCA (Jiménez *et al.*, 2007), de la misma manera descrita anteriormente en el apartado 1.4.

En el modelo de hipertensión DOCA-sal, se realizaron, además, estudios funcionales en arterias mesentéricas en un miógrafo isométrico (Multi Myograph System-610M Danish Myo Technology). Para ello, una vez aislada la segunda rama de la arteria mesentérica, se cortó en segmentos de unos 2 mm de longitud y

entre 400 - 500 μm de diámetro. 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/m^2 .

2.4.1. Protocolos experimentales ex vivo.

2.4.1.a. 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 anillos precontraídos con Phe (10^{-6} M). Los resultados se expresaron como % de relajación respecto a la precontracción inicial con Phe.

2.4.1.b. 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 precontraídos con Phe (10^{-6} M). Los resultados se expresaron como % de relajación respecto a la precontracción inicial con Phe.

2.4.1.c. Para estudiar la respuesta contráctil dependiente de endotelio se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh en anillos inicialmente estimulados con KCl 80 mM para obtener una contracción de referencia. Tras lavar con solución de Krebs la preparación para eliminar el KCl y volver a la situación inicial de estabilidad, se incubaron los anillos aórticos durante 30

minutos con el inhibidor de la NOS, L-NAME (10^{-4} M), y posteriormente la ACh se fue añadiendo de forma acumulativa (10^{-8} - 10^{-4} M). En estos experimentos las respuestas contráctiles a ACh se expresaron como porcentaje de la respuesta inducida por KCl.

2.4.2. Experimentos *in vitro*.

2.4.2.a. Para analizar los efectos del GW0742 sobre la respuesta a vasoconstrictores se realizaron una serie de experimentos en anillos de aorta de ratas Wistar incubados *in vitro* con GW0742 (10^{-6} M) durante 6 horas en el baño de órganos, y con o sin una preincubación de 1 hora con GSK0660 (10^{-6} M). Posteriormente se realizó una curva concentración-respuesta a KCl (8 - 80 mM), Phe (10^{-9} - 10^{-5} M), Ang II (10^{-9} - 10^{-6} M) y ET-1 (10^{-9} - 10^{-6} M).

2.4.2.b. Para evaluar el efecto del GW0742 sobre la disfunción endotelial inducida por ET-1, se realizó una curva concentración respuesta a Phe (10^{-9} - 10^{-5} M) y a ACh (10^{-9} - 10^{-4} M) en anillos aórticos con endotelio intacto, incubados con ET-1 a 10^{-8} M y/o GW0742 (10^{-5} y 10^{-6} M) durante 4 horas.

2.4.2.c. Para estudiar el efecto vasodilatador del GW0742 en arterias mesentéricas se realizó:

- a) Una curva concentración respuesta a Phe (10^{-7} - 10^{-4} M), incubando con el GW0742 a 1, 10 y 30 μ M.
- b) Una curva concentración-respuesta con GW0742 (10^{-7} - 10^{-5} M) en arterias precontraídas con Phe (5 μ M). Se repitió este experimento en arterias incubadas previamente con L-NAME (10^{-4} M) durante 20 minutos o con GSK0660 10^{-6} M durante 1 hora.

2.5. Determinaciones en orina.

2.5.1. Determinación de 8-iso-prostaglandina (iso-PG) F_{2α}.

Para el ensayo se usaron 50 µl de orina. La iso-PGF_{2α} total se midió usando un kit de inmunoensayo (Cayman Chemical, USA), y los resultados se expresaron en ng excretados durante 24 h por 100 g de peso corporal de la rata. También se realizó en un homogeneizado de aorta (0,005 % butilato hidroxitolueno (BHT, *Butylated HydroxyToluene*), 10⁻⁷ M fosfato sódico dibásico y 10⁻³ M ácido etilendiamino tetracético (EDTA), 1 mL de tampón por 100 mg de tejido)

2.6. Determinaciones en plasma.

Las concentraciones plasmáticas de glucosa, triglicéridos, HDL y las concentraciones de colesterol total se determinaron por métodos colorimétricos utilizando kits Spinreact (Spinreact, S.A., España). La concentración plasmática de ácidos grasos libres se determinó utilizando el kit NEFA Wako C (Wako Chemicals, Richmond, EE.UU.). La concentración plasmática de la insulina se cuantificó mediante un sistema de enzimoensayo de insulina de rata (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Las concentraciones plasmáticas del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) se determinaron utilizando un kit de ELISA (Diacclone, Inc., Besancon, Francia) específicos para TNF-α de rata.

2.6.1. Determinación del nivel de peroxidación lipídica.

El contenido en malonildialdehído plasmático (MDA) se evaluó como se describe en Duarte *et al.*, 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.

2.6.2. Determinación de los niveles de ET-1 (Experimento II).

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

2.6.3. Prueba de tolerancia oral a la glucosa (Experimento I).

A seis ratas con 18 h de ayuno de cada grupo se les administró una solución de glucosa al 50 % en agua por sonda gastroesofágica en dosis de 1,75 g/Kg de peso corporal. Las muestras de sangre (0,4 mL) se obtuvieron en ratas conscientes de la arteria carótida previamente canuladas en tubos capilares heparinizados a los 0, 30, 60 y 120 min. Las muestras de sangre fueron enfriadas en hielo y se centrifugaron durante 20 minutos a 5000 g a 4 ° C, y el plasma fue congelado a -80 ° C.

2.7. Análisis histológico (Experimento I).

Los cambios en la estructura de la pared arterial se estudiaron a través de la medición de la capa media en la arteria mesentérica. Se obtuvieron secciones de arterias mesentéricas de la segunda rama, una muestra por disección de los vasos mesentéricos. Las arterias fueron inmediatamente inmersas en una solución de Krebs libre de calcio durante 30 minutos. Posteriormente, se fijaron en formaldehído al 10 %, se deshidrataron sumergiéndolos en un gradiente descendente de etanol y se embebieron en parafina. En cada arteria se realizaron una serie de cuatro secciones de 5 micras con un microtomo de precisión y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El grosor de la pared de la arteria (AM), el diámetro de la luz (DL), el área de la transversal media (AMT) y relación media-lumen (M/L) se midieron utilizando un ordenador equipado con un analizador de imágenes Leica Q500MC conectado a una cámara de vídeo de un Leica Leitz DMRB microscopio.

Para estudiar los cambios estructurales en el ventrículo izquierdo y en el riñón utilizamos la técnica del tricrómico de Masson. Los ventrículos izquierdos y los riñones de todos los grupos experimentales fueron fijados en 10 % de formalina

tamponada y embebidos en parafina. Se cortaron dos secciones consecutivas en 4 μm y se tiñeron con hematoxilina y eosina y con tricrómico de Masson (MTC). Mediante esta tinción podemos observar el citoplasma celular de color rojo-rosado, los núcleos celulares de color azul-negruzco y las fibras y reticulina en azul claro.

La media de los diámetros de los cardiomiocitos fueron determinados de un mínimo de 30 células por corazón.

El grado de fibrosis se calcula midiendo el área de tejido conjuntivo intersticial (tinción verde con MTC) en relación con la superficie total observada en campos representativos del miocardio. Las microfotografías y la histomorfometría se realizaron utilizando el software del ordenador "Cell A" (Olympus).

2.8. Medición de la producción vascular de O_2^- .

La producción de O_2^- en anillos aórticos intactos se cuantificó mediante quimioluminiscencia con lucigenina, como se describió previamente por Ohara *et al.*; 1993. Se incubaron anillos aórticos de todos los grupos experimentales durante 30 min a 37 ° 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 . Los cambios en la liberación de O_2^- se determinaron 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 producción de O_2^- se expresó como

unidades relativas de luminiscencia (RLU)/minuto/mg de tejido seco. En algunos casos también se estimuló durante 5 min con Ang II 10^{-6} M.

También se realizaron medidas de quimioluminiscencia en anillos de ratas Wistar, que se incubaron durante 6 h con o sin GW0742 (10^{-6} M) y con o sin previa incubación (1 h) con el antagonista PPAR β , GSK0660 (10^{-6} M) y los últimos 5 min con Ang II (10^{-6} M).

2.9. Detección *in situ* del contenido vascular de $O_2^{\cdot-}$.

La detección *in situ* de la producción vascular de radicales $O_2^{\cdot-}$ se realizó mediante la técnica del dihidroetidio (DHE) (Lodi *et al.*, 2006). Utilizamos DHE para localizar $O_2^{\cdot-}$ en secciones aórticas. El DHE entra en las células y es oxidado por el $O_2^{\cdot-}$ 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 O_2^- fue calculada de la relación entre la fluorescencia de etidio/DAPI.

2.10. Expresión vascular de diferentes proteínas mediante Western Blot.

2.10.1. Para analizar la expresión proteica de **eNOS, fosfo-eNOS y 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.

2.10.2. Para la determinación de la subunidad **p47^{phox}** y **p22^{phox}** 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.

2.10.3. La composición del tampón de homogeneización utilizado para **fosfo-ERK1/2, ERK1/2, fosfo-AKT y AKT** (pH 7,5) fue (en mM): HEPES 20, EGTA 10, β -glicerol fosfato 40, MgCl₂ 2,5, DTT 1, iodometamida 1, Na₃VO₄ 2, PMSF 0,5, aprotinina 40 μ g/mL, leupeptina 4 μ g/mL e igepal al 1 %.

2.10.4. La composición del tampón de homogeneización para **PDK-4, CPT-I y PPAR- β** fue (en mM): HEPES 10, KH₂PO₄ y K₂HPO₄ 50, EGTA 10, benzamidina 1, aprotinina y pepstatina 5 μ g/mL y leupeptina 1 μ g/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.

Los western blots se llevaron a cabo con 40 μ g de proteína. La cantidad de proteína por muestra se determinó mediante la técnica de BCA. Las proteínas fueron entonces suspendidas en tampón de carga y desnaturalizadas mediante calor durante 5 minutos a 100 ° C.

Se siguieron los mismos pasos que en el apartado 1.5.2.

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 |
| 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-PPARβ (Santa Cruz Biotechnology) | caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich) | 10 % | 60 |
| policlonal de cabra anti-PDK4 (Santa Cruz Biotechnology) | conejo anti-caprino conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich) | 10% | 46 |
| policlonal de cabra anti-CPTI (Santa Cruz Biotechnology) | conejo anti-caprino conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich) | 9% | 86 |
| policlonal de conejo anti-ERK 1/2 (Cell Signaling Technology) | caprino anti-conejo conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich) | 12 % | 42-44 |
| policlonal de ratón anti-fosfo-ERK1/2 (Sigma-Aldrich) | caprino anti-ratón conjugado con peroxidada (Sigma-Aldrich) | 12 % | 42-44 |

2.11. 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. 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 fue realizada usando Syber Green con ROX como fluoróforo de referencia (i^{Taq}™ SYBR® Green Supermix with ROX sample, Biorad laboratorios, California, EEUU), a partir del cDNA ya extraído como se describió anteriormente. 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 actin | AATCGTGCGTGACATC AAAG | ATGCCACAGGATTCCA TACC |
| <i>P47^{PHOX}</i> | P47 ^{phox} | AAAGAAACCGTGCTGA CTGG | AGTTACAGGCCGATG TGACC |
| <i>P22^{PHOX}</i> | P22 ^{phox} | GCGGTGTGGACAGAAG TACC | CTTGGGTTIAGGCTCA ATGG |
| <i>PDK-4</i> | Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 | AGGTCGAGCTGTTCTC CCGCT | GCGGTCAGGCAGGAT GTCAAT |
| <i>CPT-1</i> | Carnitine palmitoyltransferase 1 | TTCACTGTGACCCCAGA CGGG | AATGGACCAGCCCCAT GGAGA |
| <i>RGS4</i> | Regulator of G-protein signaling 4 | CAAGAAATGGGCTGAA TCG | CCTCTCTGGTGCAAGA ATCC |

Material y métodos

| | | | |
|---------------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| <i>RGS5</i> | Regulator of G-protein signaling 5 | AGCTCTGCCCACTCAT GC | GAAGTTTGTCCAGGG ATTGG |
| <i>IL-6</i> | Interleukin-6 | GATGGATGCTTCCAAA CTGG | AGGAGAGCATTGGAA GTTGG |
| <i>TNF-α</i> | Tumor necrosis factor- alpha | ACGATGCTCAGAAAACA CACG | CAGTCTGGGAAGCTC TGAGG |
| <i>IL-1</i> | Interleukin-1 | GTCACTCATTGTGGCT GTGG | GCAGTGCAGCTGTCT AATGG |
| <i>ICAM-1</i> | Intercellular adhesion molecule 1 | TCCITACCTGGACAAGA AGG | CACGTCCCTGGTGATA CTCC |
| <i>PPAR-β</i> | Peroxisome proliferator- activated receptor beta | CATTGAGCCCAAGTTC GAGT | GGTTGACCTGCAGAT GGAAT |
| <i>PPP3CA</i> | Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isozyme | CCGAATTAACGAGAGG ATGC | CCCAGAGCAAACAAG CTACC |
| <i>TGF-β 1</i> | Transforming growth factor, beta 1 | GTCAACTGTGGAGCAA CACG | CCTGTATTCCGTCTCC TTGG |
| <i>PPAR-A</i> | Peroxisome proliferator activated receptor alpha | TGTGACTGGTCAAGCT CAGG | CTCCGGAACCTCTCCT CTCC |
| <i>PPAR-G</i> | Peroxisome proliferator activated receptor alpha | AAGAACCATCCGATTG AAGC | CCAACAGCTTCTCCTT CTCG |
| <i>NOX-1</i> | NADPH oxidase-1 | TCTTGCTGGTIGACACT TGC | TATGGGAGTGGGAAT CTGG |
| <i>NOX-2</i> | NADPH oxidase-2 | ACCAAGGTGGTCACTC ATCC | TCCAGGCATCTTGA CTCC |
| <i>NOX-4</i> | NADPH oxidase-4 | ACAGTCCTGGCITACCT TCG | TTCTGGGATCCTCATT CTGG |
| <i>ET-1</i> | Endothelin receptor type A | ACCAAGACGTGAAGGA CTGG | TGACAACCAAGCAGA AGACG |
| <i>AT-1</i> | Angiotensin II receptor, type 1 | ACCCTCTACAGCATCAT CTTTGTGGTGGGG | GGGAGCGTCGAATTC CGAGACTCATAATGA |
| <i>PreproET-1</i> | Preproendothelin-1 | CTCGCTCTATGTAAGTC ATGG | GCTCCTGCTCCTCCTG ATG |

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).

2.12. 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: $E = E_{\max} / (1 + 10^{-k * ([\text{fármaco}] - pD_2)})$, 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.

2.13. 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, conejo anti-fosfo-Akt-ser-473 y conejo-anti-Akt de Cell Signalling Technology, Massachwetts, EE.UU. 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).

DOCA se obtuvo de ICN Biomedicals Inc. (Ohio, EE.UU.). Todos los reactivos y productos químicos se disolvieron en agua destilada, excepto GW0742

que se mezcló con metilcelulosa al 1 % y DOCA que se mezclaba con etanol/aceite de sésamo (1:5, v/v) para experimentos *in vivo*. Para experimentos *in vitro* GW0742 y L164051 se disolvieron en DMSO.

Resultados.

Resultados

1. Resultados de reactividad vascular.

1.1. Efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β .

La adición de Phe (0,3 μ M) al baño de órganos produjo una vasoconstricción sostenida de la aorta, alcanzando valores estables de 1600 ± 153 mg. La posterior adición de L165041 ó GW0742 a concentraciones terapéuticas (μ M) (Takata *et al.*, 2008), provocó una relajación concentración-dependiente que alcanzó el estado de equilibrio a los 15 min (Figura 5A). La respuesta contráctil en los anillos controles, a los que se les añadió el vehículo (DMSO), se mantuvo prácticamente estable (menos del 10 % de relajación después de 90 min).

La eliminación mecánica del endotelio redujo significativamente el efecto vasodilatador de ambos agonistas. Por otra parte, en anillos aórticos con endotelio funcional, la inhibición de la eNOS con L-NAME (10^{-4} M) redujo la relajación inducida por ambos agonistas, lo que sugiere que esta respuesta vasodilatadora está relacionada con el NO derivado de endotelio (Figura 5B y 5C).

Ni L165041 (10^{-5} M), ni GW0742 (10^{-5} M) modificaron la respuesta relajante independiente de endotelio inducida por NPS en anillos precontraídos con Phe ($pD_2 = 8,74 \pm 0,33$ para los controles; $8,91 \pm 0,22$ para anillos preincubados con L165041 y $8,82 \pm 0,33$ para anillos preincubados con GW0742 ($n = 5-7$)).

En anillos de aorta sin endotelio, la preincubación con L165041 ó GW0742 30 μ M inhibió las respuestas contráctiles inducidas por Phe (10^{-8} - 10^{-6} M) o por U46619 (10^{-8} - 10^{-7} M). En otra serie de experimentos, L165041 y GW0742 (a contracciones $\geq 10^{-5}$ M) también inhibieron la contracción fásica inducida por Phe en ausencia de calcio extracelular (60 ± 7 y 25 ± 7 %, respectivamente, a 30 μ M).

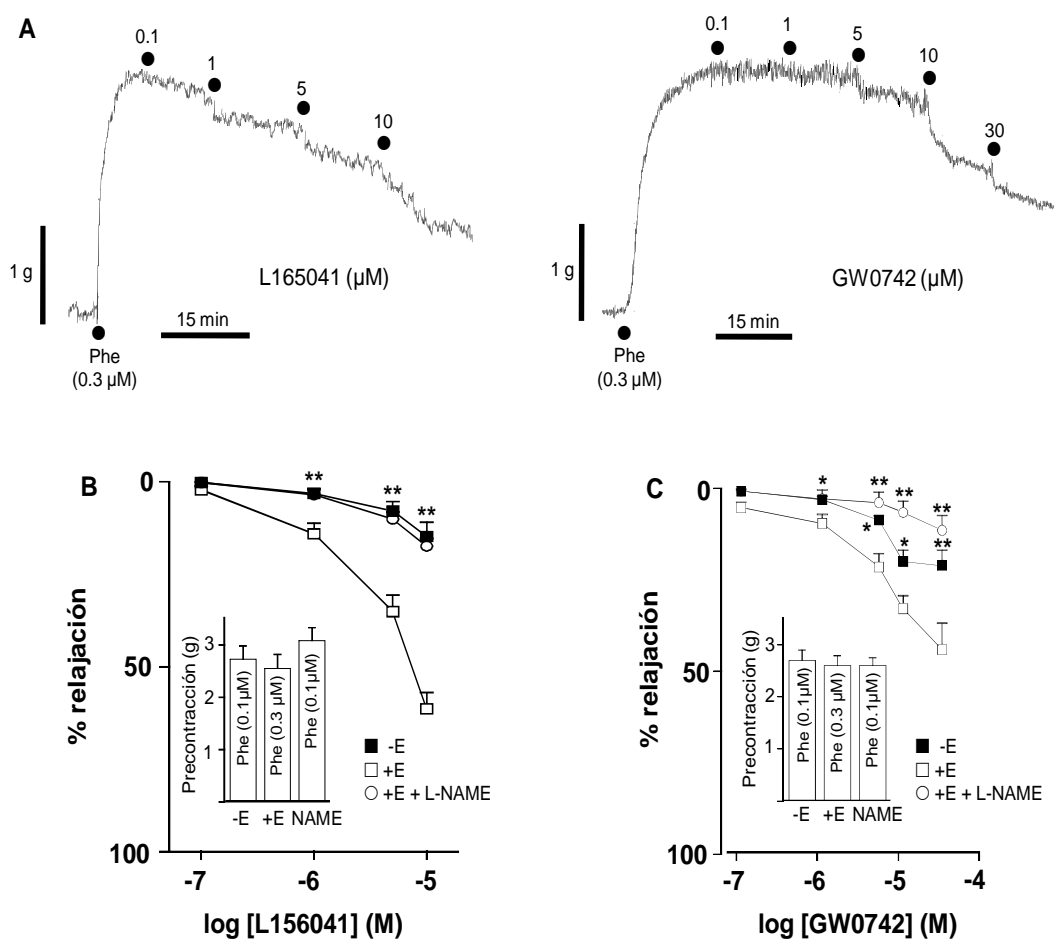


Figura 5. Efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β . (A) Registros representativos del efecto relajante inducido por L165041 (0,1 a 10 μM) ó GW0742 (0,1 a 30 μM) en anillos aórticos intactos, precontraídos con Phe. Se realizaron curvas concentración-respuesta a los agonistas PPAR β , L165041 (B) y GW0742 (C) en anillos aórticos con (+E) o sin (-E) endotelio funcional, precontraídos con Phe y en presencia de L-NAME (10⁻⁴ M) durante 20 min. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 6-12$ anillos de ratas diferentes). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs anillos control con +E. Los histogramas representan el tono contráctil inducido por Phe antes de la adición del agonista PPAR β en las diferentes condiciones experimentales.

1.2. El papel de PPAR β y PPAR γ sobre los efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β .

La presencia del antagonista PPAR γ , GW9662, no modificó las respuestas relajantes, tanto del L165041 como del GW0742 en arterias intactas precontraídas con Phe (Figura 6A y 6B). Sin embargo, el antagonista PPAR β , GSK0660, inhibió significativamente estos efectos relajantes en arterias con endotelio funcional (Figura 6A y 6B), no teniendo efecto en los anillos de aorta sin endotelio (Figura 6C y 6D).

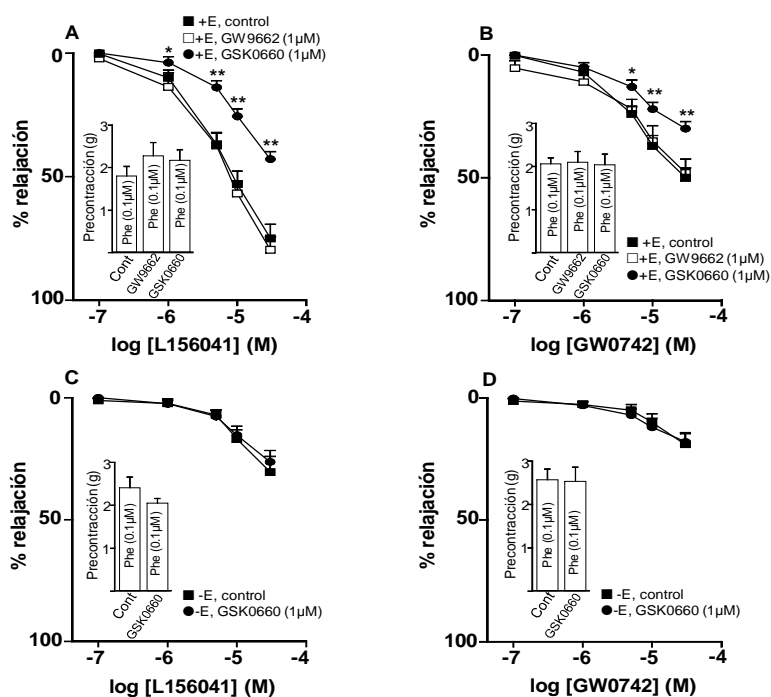


Figura 6. Efectos del antagonista PPAR γ , GW9662 y del antagonista PPAR β , GSK0660 en las respuestas vasodilatadoras inducidas por los agonistas PPAR β . Anillos aórticos con (A y B) o sin endotelio (C y D) se incubaron en ausencia o en presencia de GW9662 (1 μ M) ó GSK0660 (1 μ M) durante 1 hora antes de la adición de Phe, y se realizó una curva concentración-respuesta a los agonistas PPAR β , L165041 (A) ó GW0742 (B) (0,1 a 30 μ M), de manera acumulativa. Los resultados son la media \pm SEM ($n = 7-9$ experimentos). Los histogramas representan el tono contráctil inducido por Phe antes de la adición del agonista PPAR β en las diferentes condiciones experimentales.

Ninguno de estos inhibidores modificó la curva concentración-respuesta para las relaciones inducidas por ACh o NPS (Figura 7).

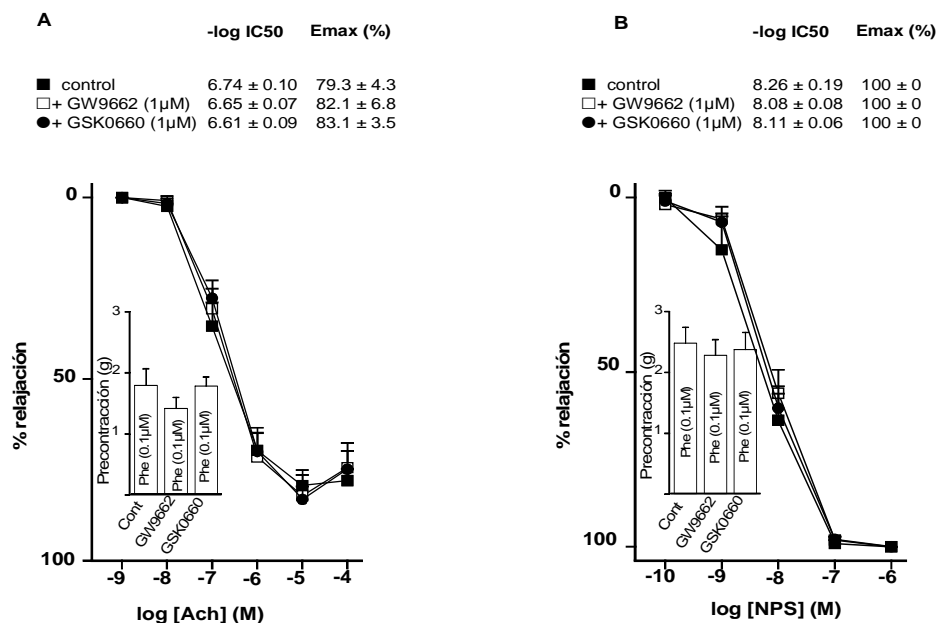


Figura 7. Efectos vasodilatadores (A) de ACh y (B) NPS no se vieron afectados por el antagonista PPAR γ , GW9662 o el antagonista PPAR β , GSK0660. Anillos aórticos con endotelio se incubaron en ausencia o en presencia de GW9662 (1 μ M) ó GSK0660 (1 μ M) durante 1 h antes de la adición de Phe y se realizó una curva concentración-respuesta a ACh o a NPS. Los resultados son la media \pm SEM ($n = 7-9$ experimentos). Los histogramas representan el tono contráctil inducido por Phe antes de la adición de ACh o NPS en las diferentes condiciones experimentales.

1.3. Implicación del calcio en los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio de los agonistas PPAR β .

Los agonistas PPAR β relajaron los anillos aórticos con endotelio intacto precontraídos con el análogo del tromboxano A₂, U46619 (0,1 μ M). Estos efectos relajantes fueron inhibidos por la eliminación del endotelio vascular. La relajación dependiente de endotelio inducida por L165041 ó GW0742 en los anillos precontraídos con U46619 no se vio afectada por la eliminación del calcio

extracelular. Por otra parte, la incubación de los anillos aórticos en solución Krebs libre de calcio que contiene un quelante intracelular de calcio, BAPTA-AM, no modificó significativamente las relajaciones dependientes de endotelio inducidas por ambos agonistas (Figura 8).

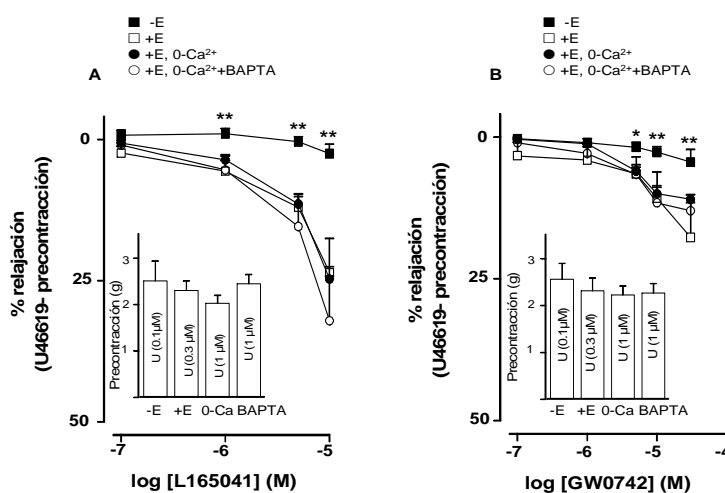
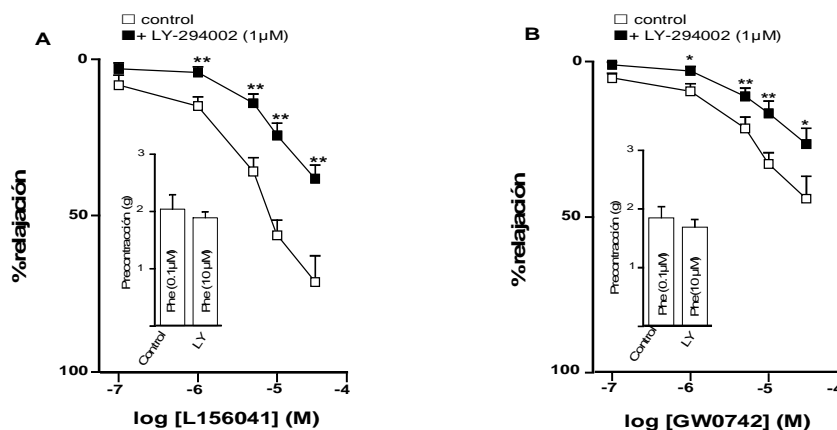


Figura 8. La participación de Ca^{2+} en los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio de los agonistas PPAR β . Los efectos relajantes inducidos por L165041 (0,1 a 10 μ M) (A) ó GW0742 (0,1 a 30 μ M) (B) fueron estudiados en anillos aórticos con (+E) o sin (-E) endotelio incubados en solución normal de Krebs y precontraídos con U46619 (U). En algunos experimentos, se realizó una curva concentración-respuesta a L165041 ó GW0742 en anillos aórticos intactos en solución Krebs libre de Ca^{2+} con o sin la adición del quelante de calcio intracelular, BAPTA, durante 30 min antes de añadir U46619. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n=8-14$ anillos de ratas diferentes). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs anillos +E. Los histogramas representan el tono contráctil inducido por U antes de la adición del agonista PPAR β en las diferentes condiciones experimentales.

1.4. Papel de la PI3-kinasa en los efectos vasodilatadores dependientes de endotelio producidos por los agonistas PPAR β .

A continuación, investigamos mecanismos potenciales de activación de la eNOS independientes de calcio, tales como la vía PI3K. En presencia del inhibidor de PI3K, LY-294002, las respuestas relajantes, tanto del L165041 como

del GW0742 en arterias precontraídas con Phe, se inhibieron significativamente (Figura 9).



1.5. Efectos de los agonistas PPAR β en la producción de óxido nítrico en HUVECs.

La exposición de HUVECs al ionóforo de calcio A23187 (1 μ M) aumentó significativamente la intensidad de fluorescencia de DAF-2 en comparación con las células control (Figura 10A). Este aumento no se vio afectado por el inhibidor de PI3K, LY-294002 (191 \pm 16 y 224 \pm 24 unidades arbitrarias, n = 8, medida a los 30 min en presencia o ausencia de LY-294002, respectivamente).

Del mismo modo, L165041 ó GW0742, de manera concentración y tiempo-dependientes, aumentaron la producción de NO sensible al L-NAME en HUVECs (Figura 10B y 10C). Esta producción de NO, medida a los 30 min, se

redujo en parte por el inhibidor de PI3K, LY-294002, y por el antagonista PPAR β , GSK0660, y no se vio afectada por el antagonista PPAR γ , GW9662 (Figura 10D y 10E).

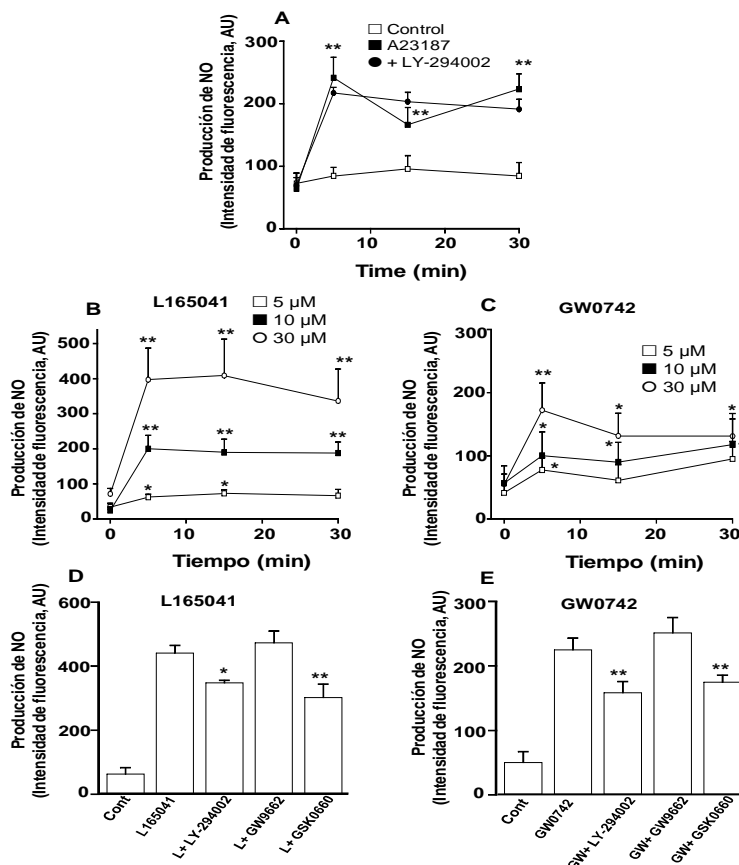


Figura 10. Medida de NO por DAF-2 en HUVEC estimuladas con A23187 (1 μ M) (A) ó L165041 (L, 1, 10 y 30 μ M) (B) ó GW0742 (GW, 1, 10 y 30 μ M) (C). Las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego fueron preincubadas con L-arginina (10⁻⁴ M en PBS, 5 min, 37 ° C). En algunos experimentos, L-NAME (10⁻⁴ M) fue añadido 15 min antes de la adición de L-arginina. La fluorescencia se midió a los 5, 15 y 30 min. La auto-fluorescencia obtenida de PBS/DAF-2 se resta de cada valor. La diferencia entre la señal de fluorescencia con y sin L-NAME fue considerada la producción de NO. Todos los datos son media \pm SEM (n = 8). * P < 0,05 y ** P < 0,01 vs tiempo 0. Efectos de la incubación HUVECs durante 30 min con el inhibidor de PI3K, LY-294002 (1 μ M), o el antagonista PPAR β , GSK0660 (1 μ M), o el antagonista PPAR γ , GW9662, sobre la producción de NO estimulada por L165041 (30 μ M) (D) ó GW0742 (30 μ M) (E) medida a los 30 min. Todos los datos son la media \pm SEM (n = 8). * P < 0,05 y ** P < 0,01 vs las columnas de L165041 ó GW0742.

1.6. Efectos de los agonistas PPAR β en la fosforilación de AKT y eNOS en HUVECs.

La incubación de HUVECs durante 15 min con L165041 ó GW0742 produjo un aumento de la fosforilación de AKT (Figura 11A y 11B) y eNOS (Figura 11C y 11D). La fosforilación de AKT y eNOS se inhibió en presencia del inhibidor de PI3K, LY-294002 y del antagonista de PPAR β , GSK0660, pero no fue afectada por la presencia del antagonista PPAR γ , GW9662.

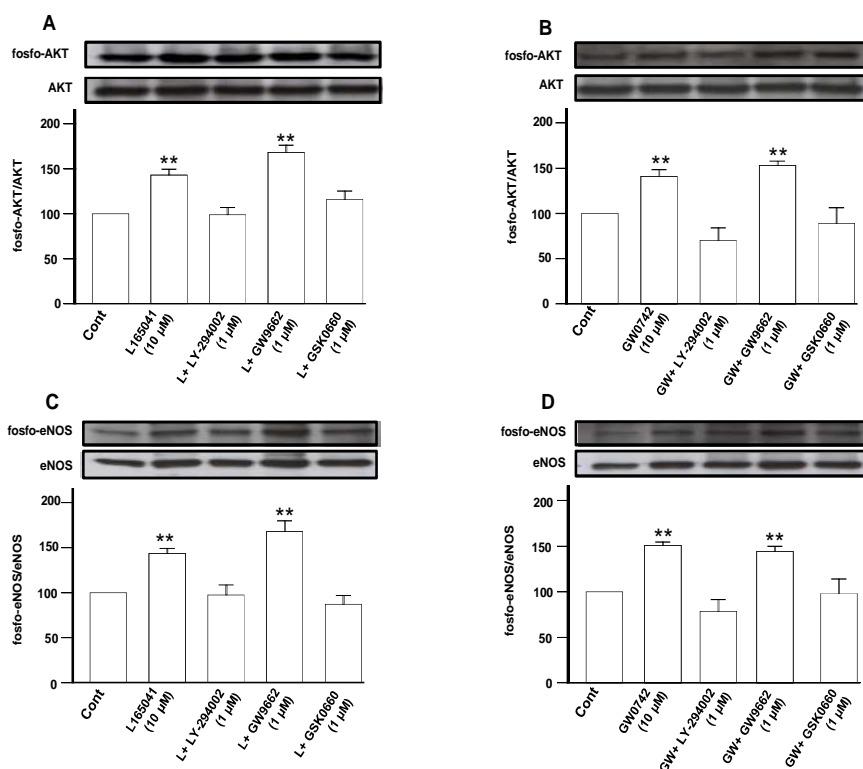


Figura 11. Efectos de L165041 (10 μ M) ó GW0742 (10 μ M), en HUVECs solas o preincubadas ya sea con el inhibidor de PI3K, LY-294002 (1 μ M), el antagonista PPAR β , GSK0660 (1 μ M), o el antagonista PPAR γ , GW9662 (1 μ M), a nivel de proteínas como fosfo-AKT (A y B) y fosfo-eNOS (C y D). Los resultados son la media \pm SEM ($n = 4-6$) de los valores densitométricos normalizados con la AKT o la eNOS correspondiente. ** $P < 0,01$ vs control.

2. Efectos *in vivo* del agonista PPAR β , GW0742, sobre la hipertensión.

A. Experimento I: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión genética en ratas SHR.

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

La administración de GW0742 durante 5 semanas produce una disminución progresiva de la presión sistólica en un 11 % ($P < 0,01$ vs SHR control) y la frecuencia cardíaca en un 8 % al final del tratamiento ($P < 0,05$ vs SHR control), sin efecto en ratas WKY (Figura 12).

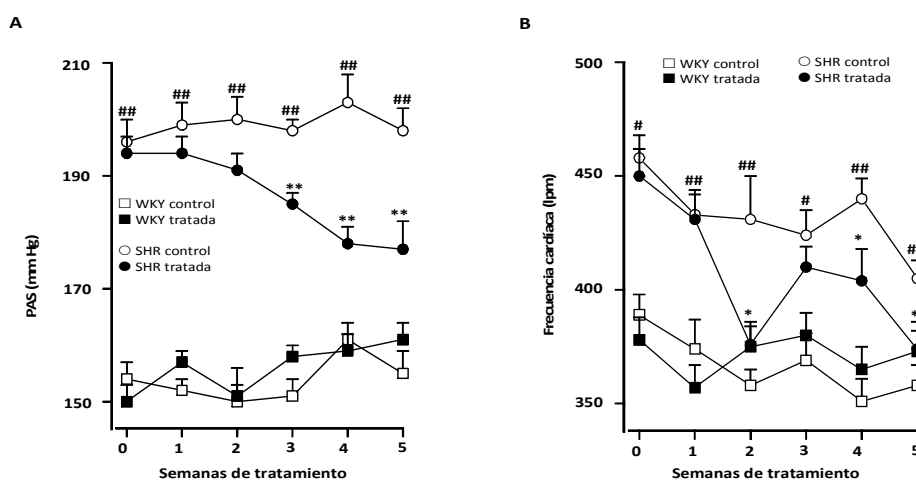


Figura 12. Efectos de la administración crónica de GW0742 sobre la presión arterial sistólica (A) y la frecuencia cardíaca (B), medida por pletismografía en SHR. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 10$). # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ vs WKY control y * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs SHR control.

El peso de las ratas se incrementó en WKY y SHR control después de 5 semanas ($10,1 \pm 0,6$ y $8,4 \pm 0,7$ %, respectivamente). El tratamiento con GW0742 redujo significativamente la ganancia de peso corporal ($6,8 \pm 0,4$ %) y de la relación grasa visceral/peso corporal al final del tratamiento sólo en ratas WKY, en comparación con las ratas control (Tabla 4). Este efecto parece no estar relacionado con cambios en la alimentación y la bebida de agua, que no se vieron afectados por GW0742. El peso del ventrículo izquierdo (PVI) y PVI en relación con el peso del corazón (PCo) y del riñón (PR) relativos al peso corporal (PC) fueron mayores en el grupo SHR control en comparación con el grupo WKY control. GW0742 no reduce PVI/PCo ni PR/PC en SHR a pesar de su efecto antihipertensivo (Tabla 4). Por otra parte, GW0742 aumentó PR/PC en WKY, posiblemente como resultado de la reducción de peso corporal.

Tabla 4. Peso corporal y de los órganos e índices cardíaco y renal.

| | WKY-control | WKY-tratado | SHR-control | SHR-tratado |
|-----------------------|-------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| PC inicial (g) | 321±4 | 315±2 | 295±5 ^{##} | 280±6 |
| PC final (g) | 357±5 | 337±2 ^{##} | 321±5 ^{##} | 307±6 ^{**} |
| PCo (mg) | 935±31 | 924±29 | 1045±30 [#] | 1055±19 |
| PVI (mg) | 688±20 | 674±22 | 812±26 ^{##} | 827±17 |
| PR (mg) | 874±11 | 912±17 | 869±16 | 867±17 |
| GV (g) | 6,4±1,1 | 4,0±0,3 [#] | 3,7±0,2 [#] | 3,9±0,2 |
| PVI/PCo | 0,73±0,01 | 0,73±0,01 | 0,78±0,01 ^{##} | 0,78±0,01 |
| PVI/PC | 1,93±0,06 | 2,00±0,06 | 2,58±0,08 ^{##} | 2,70±0,04 |
| PR/PC | 2,45±0,04 | 2,71±0,05 ^{##} | 2,71±0,05 ^{##} | 2,83±0,02 |
| GV/PC | 18,0±2,8 | 11,8±1,0 [#] | 10,9±0,6 [#] | 12,0±0,8 |

PC, peso corporal; PCo, peso del corazón; PVI, peso del ventrículo izquierdo; PR, peso del riñón; GV, grasa visceral. Los valores se expresaron como la media \pm SEM, de 20 ratas, con excepción de GV ($n = 10$). [#] $P < 0,05$ y ^{##} $P < 0,01$ vs WKY control; ^{**} $P < 0,01$ SHR control vs SHR tratadas.

La evaluación histopatológica del corazón mostró que tanto la longitud de la fibra cardíaca (Figura 13A y 13B) como la expresión de genes de calcineurina

(Figura 13C), un marcador de la hipertrofia cardíaca, se incrementaron en SHR y GW0742 los redujo. La tinción tricrómica de Masson (contenido de colágeno de tipo I) (Figura 13D) se incrementó también en SHR (área de fibrosis: $19 \pm 2 \%$) en comparación con WKY ($5 \pm 1 \%$), y se redujo con el tratamiento GW0742 ($9 \pm 2 \%$). El análisis histológico de los riñones no mostró alteraciones evidentes entre los grupos (Figura 13E).

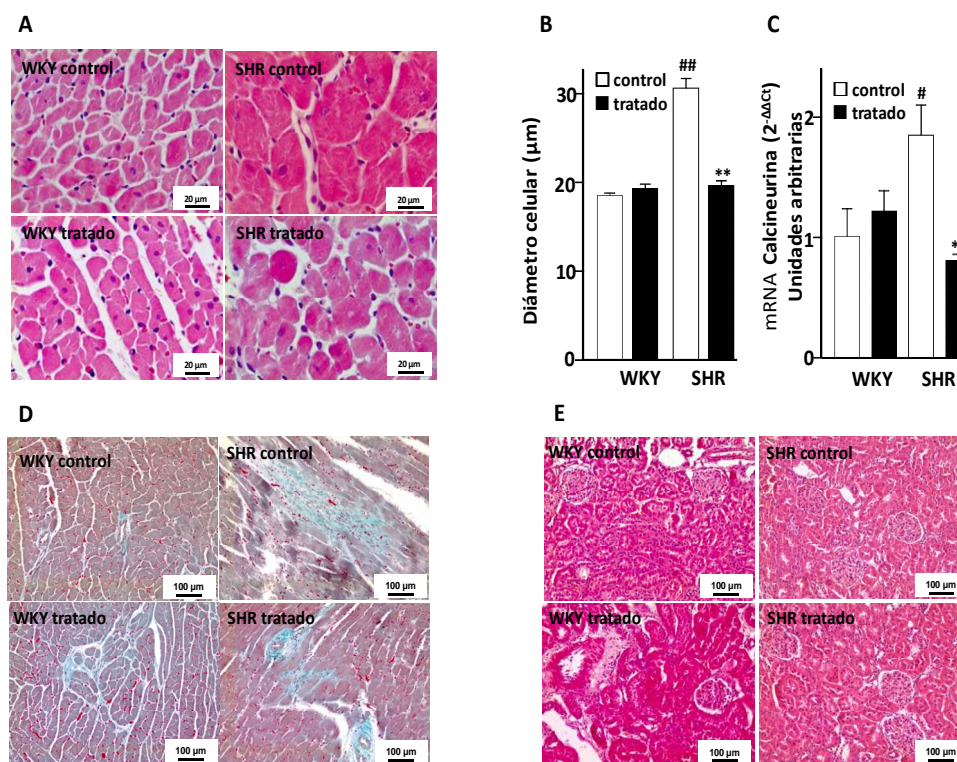


Figura 13. El análisis histológico de los efectos de GW0742 en el corazón y el riñón. Ampliaciones de las secciones del corazón teñido con hematoxilina y eosina (A) o tricómico de Masson (MTC, Masson trichrome) (D) y del riñón teñidas con hematoxilina y eosina (E) de todos los grupos experimentales. (B) Los valores medios \pm SEM de los diámetros de los cardiomiocitos. (C) Los niveles de mRNA de la calcineurina en el corazón en unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los resultados se mostraron como la media \pm SEM ($n = 9-10$ experimentos). ^{##} $P < 0,01$ vs WKY control. * $P < 0,05$ y ^{**} $P < 0,01$ vs SHR control.

Cuando comparamos las ratas WKY control, con ratas SHR control se vieron alteraciones estructurales en las pequeñas arterias mesentéricas, como un aumento significativo de AMT (89 %) y M/L (74 %) (Figura 14). El tratamiento con GW0742 no tuvo efecto sobre los parámetros morfológicos de los vasos mesentéricos en WKY, pero redujo significativamente todas estas alteraciones estructurales en SHR. La relación M/L mostró una buena correlación ($r = 0,9818$) con la presión sistólica entre los diferentes grupos.

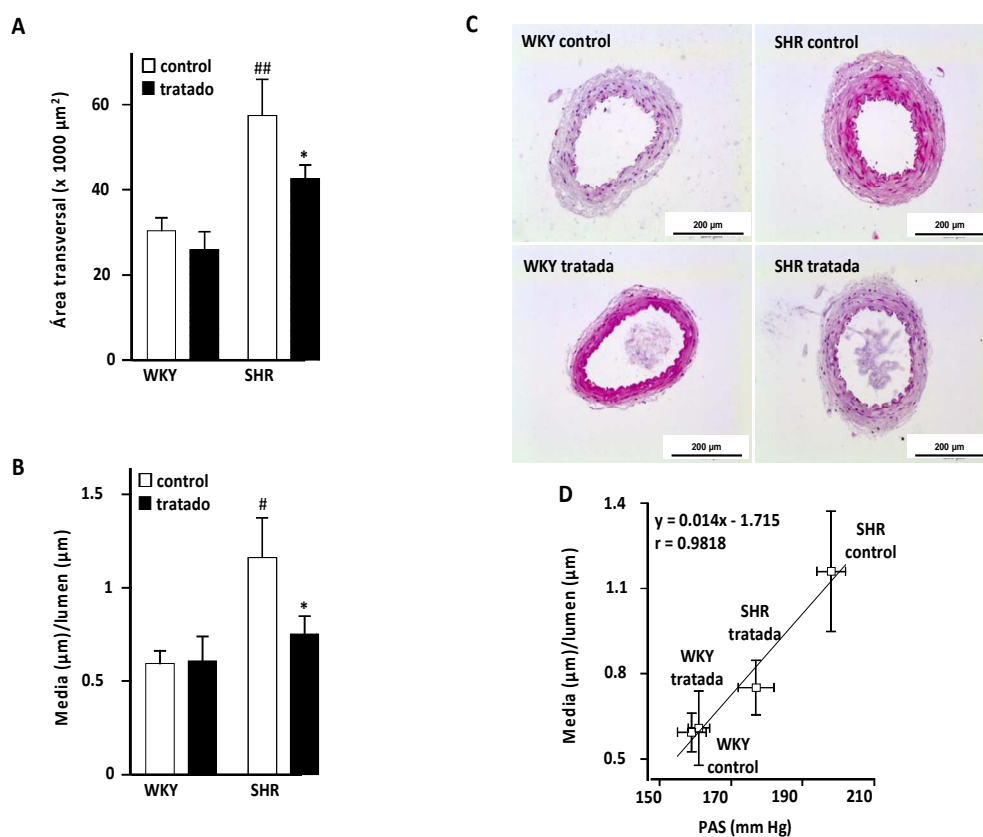


Figura 14. Efectos de GW0742 sobre los parámetros morfológicos de las arterias mesentéricas. Análisis morfométrico de la sección transversal (A) y la relación media/lumen (M/L) (B). (C) Una sección histológica representativa de tejidos embebidos en parafina que se tiñeron con hematoxilina. (D) La relación M/L en arterias mesentéricas se relacionó con la presión arterial sistólica en ratas SHR y WKY, control y tratadas. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-10$ ratas). [#] $P < 0,05$ y ^{##} $P < 0,01$ vs WKY control. ^{*} $P < 0,01$ vs SHR control.

El colesterol total, triglicéridos, ácidos grasos libres y la concentración de TNF- α plasmática no se encontraron elevados en SHR y no se vieron afectados por el tratamiento con GW0742 (Tabla 5). Los niveles de insulina y glucosa aumentaron significativamente en SHR, pero no cambiaron con el tratamiento de GW0742. Sin embargo, la tolerancia a la glucosa en las ratas SHR fue mejorada por GW0742 (Figura 15).

Tabla 5. Determinaciones plasmáticas y urinarias en WKY y SHR controles y tratadas con GW0742.

| | WKY-control | WKY-tratadas | SHR control | SHR tratadas |
|---|-----------------|-----------------|-------------------------------|------------------|
| Colesterol (mg/dl) | 53,5 \pm 2,3 | 65,2 \pm 5,6 | 48,7 \pm 1,9 | 53,7 \pm 1,6 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 38,3 \pm 2,8 | 43,4 \pm 5,7 | 32,4 \pm 1,5 | 39,2 \pm 2,5 |
| HDL (mg/dl) | 51,7 \pm 3,5 | 53,9 \pm 3,6 | 41,7 \pm 1,7 [#] | 50,3 \pm 1,8* |
| Ácidos grasos (mmol/L) | 0,59 \pm 0,07 | 0,62 \pm 0,03 | 0,57 \pm 0,04 | 0,60 \pm 0,05 |
| Glucosa (mg/dl)^a | 127,5 \pm 7,4 | 130,7 \pm 6,0 | 155,9 \pm 5,0 ^{##} | 146,1 \pm 4,4 |
| Insulina (pg/ml)^a | 135 \pm 21 | 133 \pm 18 | 231 \pm 20 ^{##} | 236 \pm 35 |
| TNF-α (pg/ml) | 89,2 \pm 16,2 | 90,4 \pm 11,5 | 54,8 \pm 11,6 | 74,6 \pm 22,7 |
| MDA (μmol/L) | 14,2 \pm 0,8 | 16,1 \pm 0,8 | 25,0 \pm 1,4 ^{##} | 18,8 \pm 1,3** |
| isoPGF2α orina (ng/24 h/100 g) | 1,18 \pm 0,10 | 1,49 \pm 0,28 | 2,78 \pm 0,15 ^{##} | 2,03 \pm 0,26* |

Valores expresados como la media \pm SEM de 10 ratas (^a n = 16). [#] P < 0,05 y ^{##} P < 0,01 vs WKY control.

* P < 0,05 y ** P < 0,01 SHR tratadas vs SHR control.

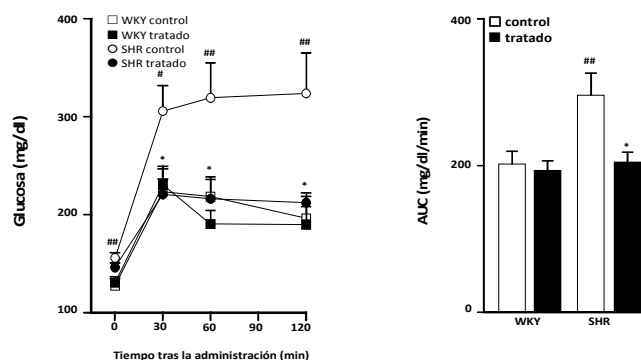


Figura 15. Efectos de GW0742 en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Las ratas se mantuvieron en ayuno durante 18 h antes de la administración de una solución de glucosa al 50 % en agua por sonda, a una dosis de 1,75 g/Kg de peso corporal. AUC: área bajo la curva. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 6$). # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ vs WKY control. * $P < 0,05$ vs SHR control.

Los niveles plasmáticos de MDA, un marcador de la peroxidación lipídica, y la excreción urinaria a las 24h de iso-PGF_{2 α} , un marcador específico de la producción sistémica de O₂⁻, fueron mayores en SHR en comparación con las ratas normotensas. El tratamiento con GW0742 sólo redujo significativamente estos parámetros en SHR, sin provocar efecto en ratas WKY (Tabla 5).

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

La expresión de mRNA y proteica de PPAR β fue significativamente mayor en la aorta (Figura 16A y 16D) de SHR en comparación con las ratas WKY. Los niveles de mRNA de PPAR β también aumentaron en el riñón (Figura 17A), pero disminuyeron en el corazón (Figura 17B) de SHR. El tratamiento crónico con GW0742 restauró estos cambios en la expresión de PPAR β en SHR, a niveles similares a los controles WKY. El mRNA y los niveles de proteína de dos genes diana PPAR β conocidos, PDK4 (Figura 16B y 16E) y CPT-1 (Figura 17C y 17F)

en anillos aórticos de SHR control fueron similares a los encontrados en las ratas WKY. Como era de esperar, el agonista PPAR β aumentó significativamente el mRNA de estos genes, especialmente en SHR. Los niveles de mRNA de PDK4 en corazones de ratas SHR mostraron niveles reducidos en comparación con los de ratas WKY control (Figura 17C). El tratamiento con GW0742 también aumentó la expresión de PDK4 en el corazón de ambas cepas de ratas.

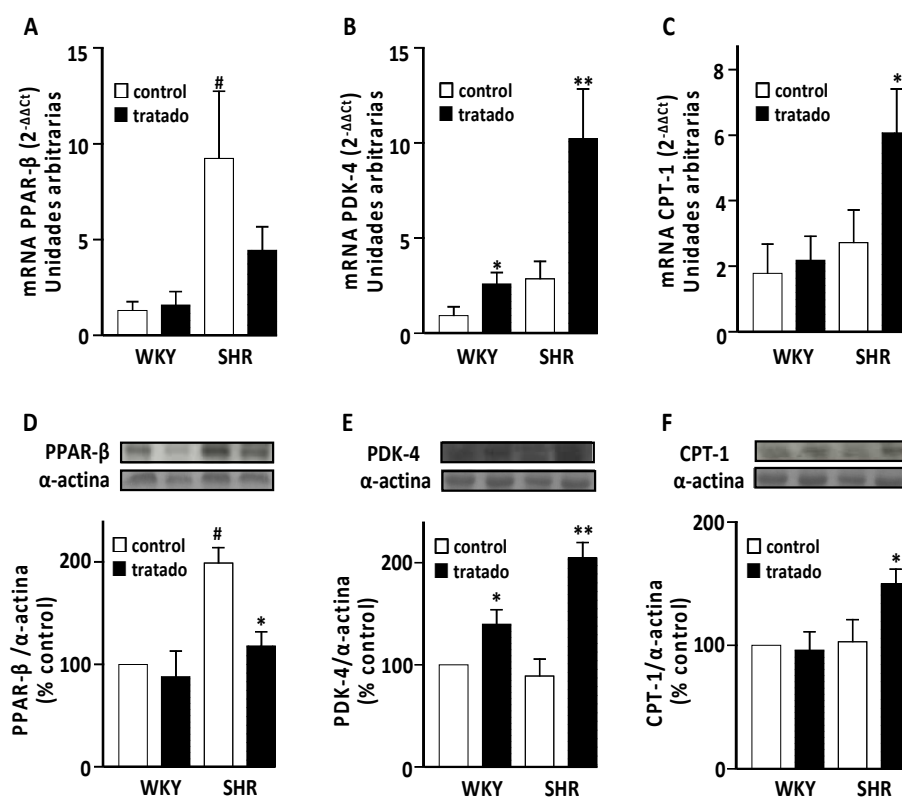


Figura 16. Efectos de GW0742 en genes diana PPAR β en aorta. La expresión de mRNA y proteica de PPAR β (A y D), PDK4 (B y E) y CPT-1 (C y F) en aortas de SHR y WKY. Los datos se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) o en valores densitométricos con la banda de proteínas, con la correspondiente α -actina. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 4-6$ experimentos). [#] $P < 0,05$ vs WKY control. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs ratas no tratadas.

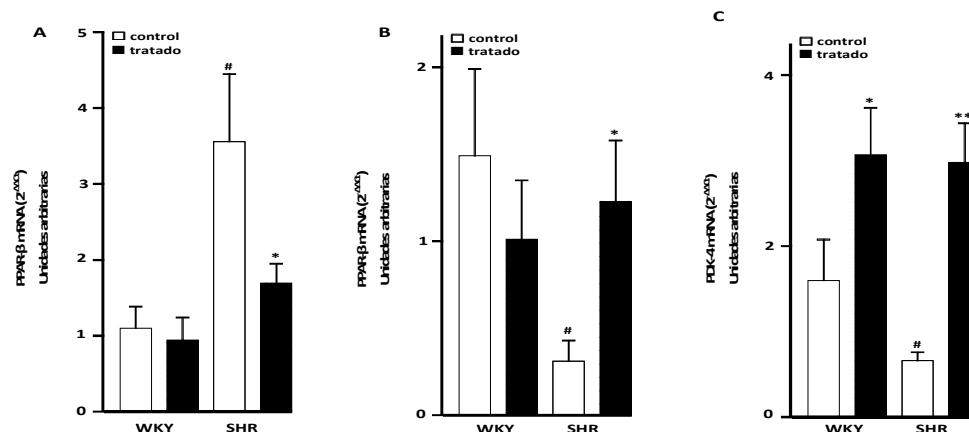


Figura 17. Efectos del GW0742 en los niveles de mRNA de PPAR β en riñón (A) y corazón (B), y de PDK4 en corazón (C) de SHR y WKY. Los datos se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 6-10$ experimentos). [#] $P < 0,05$ vs WKY control. ^{*} $P < 0,05$ y ^{**} $P < 0,01$ vs SHR control.

2.3. GW0742 mejora la disfunción endotelial en SHR al aumentar la actividad de eNOS.

Las aortas de ratas SHR control mostraron una reducción significativa en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a la ACh en arterias estimuladas con Phe en comparación con aortas de ratas WKY control ($E_{max} = 37 \pm 4 \%$ vs $78 \pm 5 \%$). GW0742 produjo un aumento significativo en la relajación inducida por ACh en ratas SHR ($E_{max} = 48 \pm 3 \%$, $P < 0,05$), sin efecto en ratas WKY (Figura 18A). En aortas de ratas WKY y SHR tratadas con GW0742, no se observaron diferencias en las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio del NPS, donador de NO, en los vasos precontraídos con Phe en comparación con sus respectivos grupos control de WKY y SHR (Figura 18B).

No se encontraron diferencias entre los grupos experimentales en la curva concentración-respuesta contráctil inducida por Phe en los anillos aórticos

intactos (Figura 18C). Sin embargo, esta respuesta se redujo significativamente en aortas de SHR en comparación con WKY cuando fueron incubadas con el inhibidor de la NO sintasa, L-NAME, lo que indica una reducción de la formación de NO basal en SHR. GW0742 aumentó esta respuesta contráctil sólo en los anillos de SHR, lo que sugiere una mayor formación de NO en estos vasos (Figura 18D).

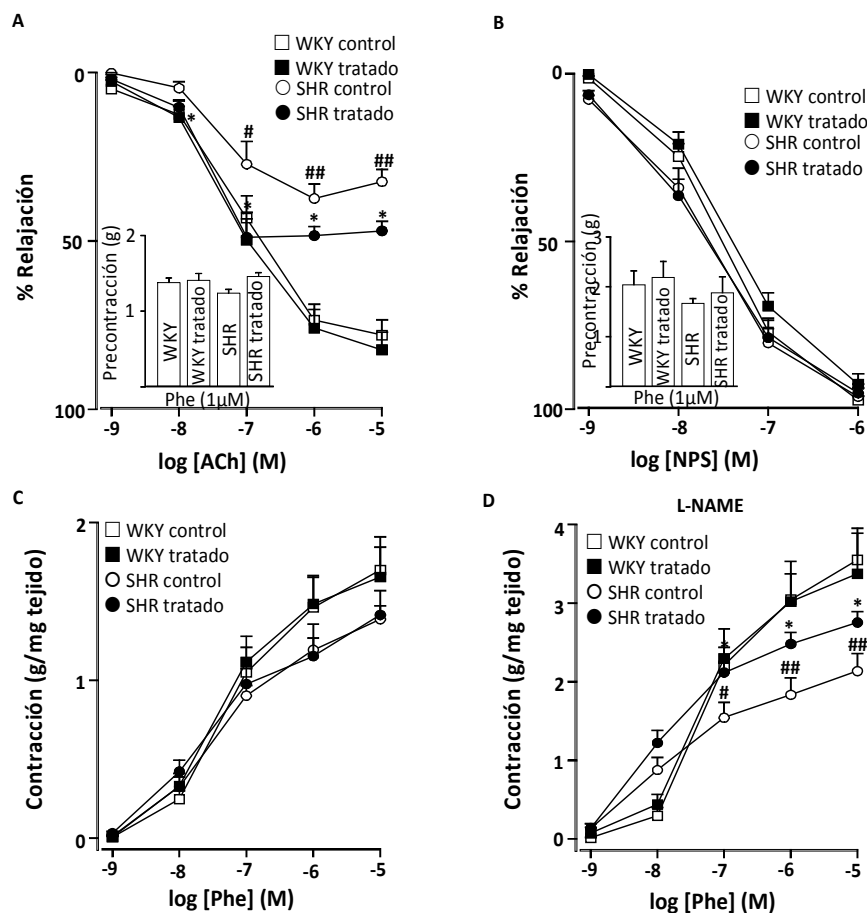


Figura 18. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial. Respuestas relajantes vasculares inducidas por ACh (A) y NPS (B) en aortas precontraídas con Phe (1 μ M), y la respuesta contráctil inducida por Phe en ausencia (C) y presencia (D) de L-NAME (10^4 M) en ratas WKY y SHR control y tratadas. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 6-9$ anillos de ratas diferentes). # $P < 0,05$ y ### $P < 0,01$ vs WKY control. * $P < 0,05$ vs SHR control.

La contracción inducida por Ang II (Figura 19) en los anillos de aorta de SHR, tanto en ausencia como en presencia de L-NAME, fue mayor que la encontrada en WKY. GW0742 redujo significativamente la vasoconstricción a Ang II, sólo en SHR.

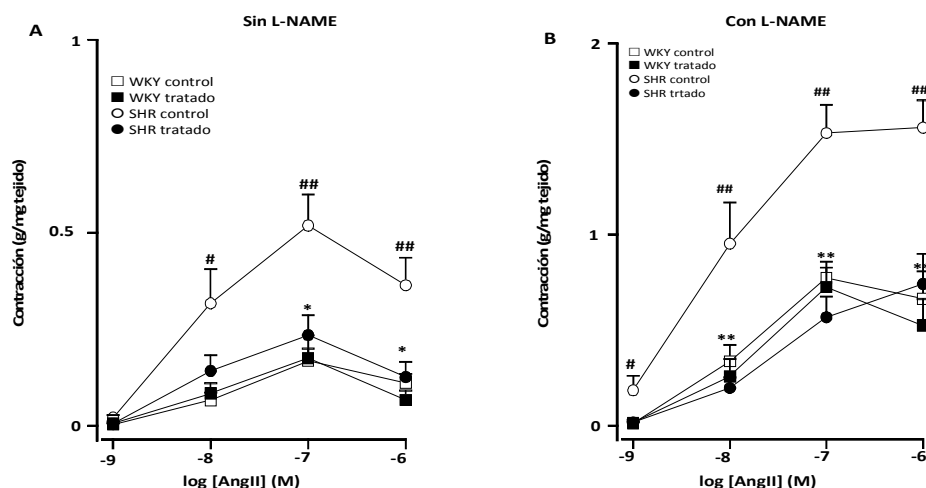


Figura 19. Efectos de GW0742 sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en ausencia (A) y presencia (B) de L-NAME (10^4 M) en ratas WKY y SHR control y tratadas. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 7-9$ anillos de ratas diferentes). [#] $P < 0,05$ y ^{##} $P < 0,01$ vs WKY control. ^{*} $P < 0,05$ y ^{**} $P < 0,01$ vs SHR control.

La expresión génica y proteica de eNOS en aorta se redujo en SHR en comparación con WKY (Figura 20A y 20B). La expresión de la caveolina-1, un regulador alostérico negativo de la eNOS, fue significativamente mayor en SHR que en WKY (Figura 20C y 20D). Después del tratamiento con GW0742, durante 5 semanas, la expresión génica y proteica de eNOS se incrementó (Figura 20A y 20B), mientras que la de caveolina-1 fue menor (Figura 20C y 20D) en SHR, pero no tuvo efecto en las ratas WKY.

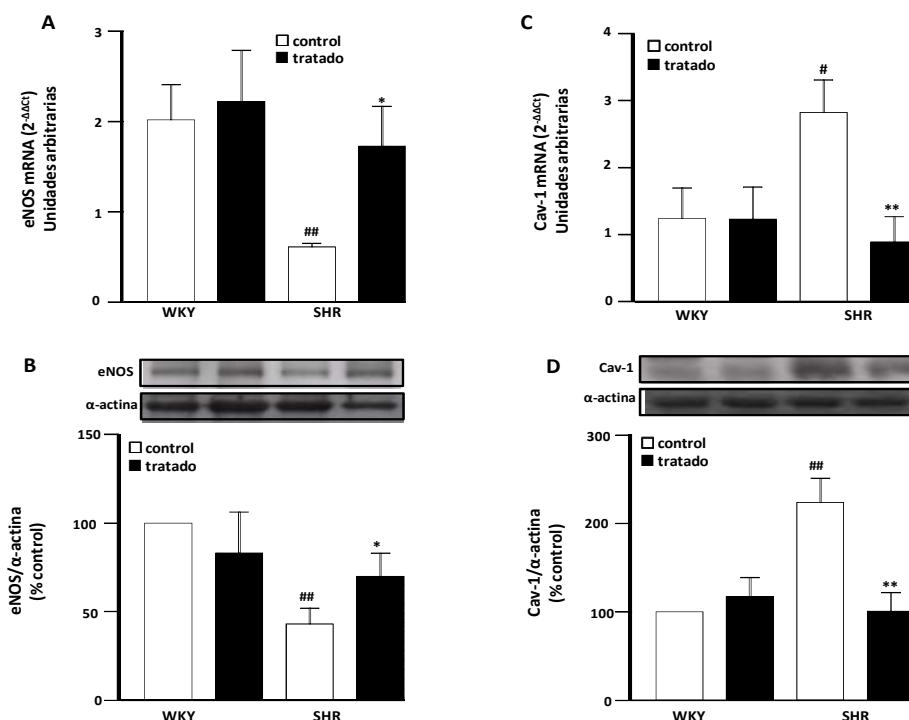


Figura 20. Efectos de GW0742 sobre la vía del NO. Efectos de GW0742 en la expresión de eNOS (A y B) y caveolina-1 (C y D) de mRNA por RT-PCR (A y C) y proteínas por western blot (B y F) en ratas WKY y SHR control y tratadas. Los datos (A y C) se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Se muestran bandas e histogramas que representan valores densitométricos normalizados α -actina en western blot (B y D) ($n = 3-5$). # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ vs WKY control. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs SHR control.

2.4. GW0742 redujo la producción de ROS vasculares en SHR al reducir la actividad NADPH oxidasa.

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 21A). 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 SHR mostraron un marcado aumento

en la tinción de la adventicia, media y las células endoteliales, en comparación con las ratas WKY y se redujo significativamente por GW0742, sólo en SHR (Figura 21A y 21B).

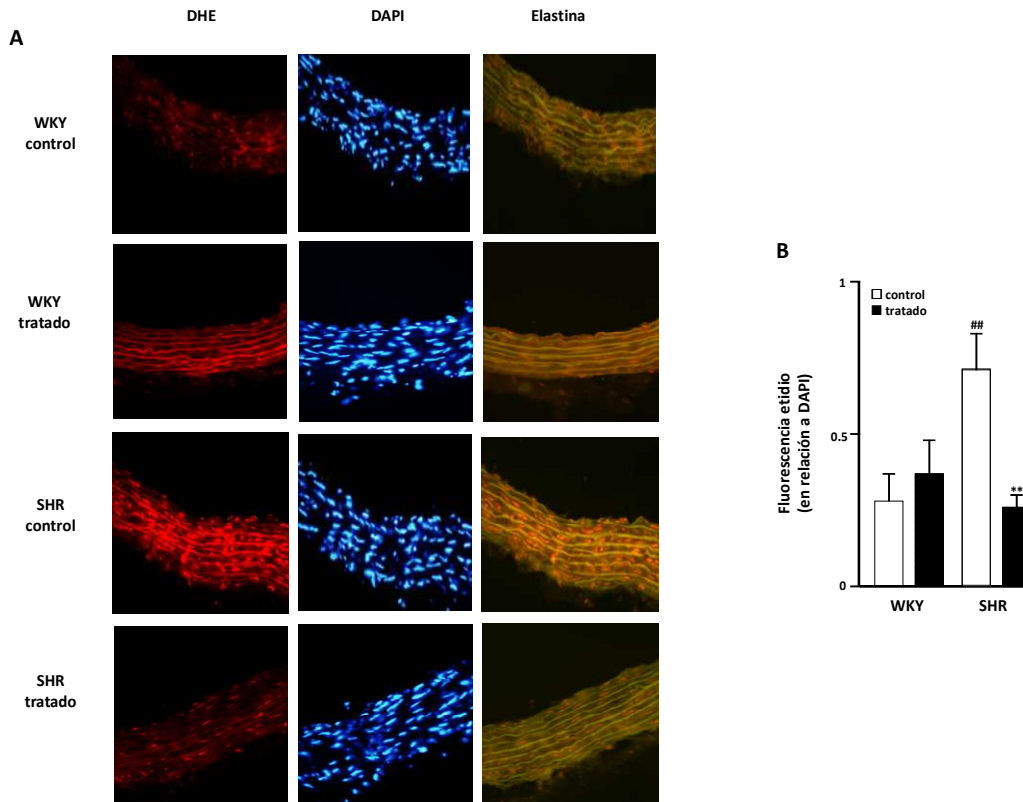


Figura 21. Efectos de GW0742 en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (A). Las imágenes de la izquierda muestran las arterias que se incubaron en presencia de DHE que produce una fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por $O_2^{\cdot-}$. Las de la derecha muestran fluorescencia azul de la tinción nuclear con DAPI ($\times 400$ aumentos) o las imágenes fusionadas con autofluorescencia verde de elastina. (B) El promedio de los valores se expresó como la media \pm SEM ($n = 5-7$ anillos de diferentes ratas) de la fluorescencia roja de etidio normalizada con el azul fluorescente DAPI. ^{##} $P < 0,01$ vs WKY control. ^{**} $P < 0,01$ vs SHR control.

El contenido en la aorta de iso-PGF_{2α} fue mayor en SHR que en WKY (Figura 22), y normalizado con GW0742.

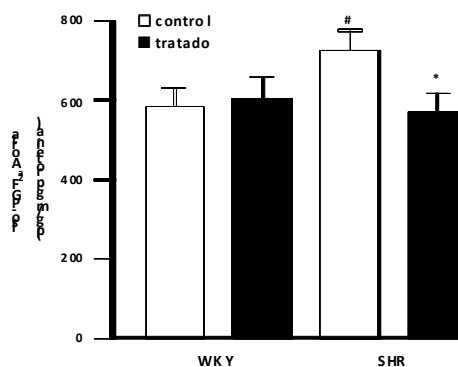


Figura 22. Efectos de GW0742 sobre el contenido de iso-PGF_{2α} en la aorta. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 7-9$ anillos de ratas diferentes). [#] $P < 0,05$ vs WKY control. ^{*} $P < 0,05$ vs SHR control.

La actividad NADPH oxidasa, tanto en condiciones basales como por la estimulación de Ang II, se vio aumentada en anillos de aorta de SHR en comparación con las ratas WKY (Figura 23A y 23B). El tratamiento crónico con GW0742 redujo la actividad NADPH oxidasa basal y la estimulada con Ang II, sólo en SHR. Se observó una sobreexpresión proteica y génica de las subunidades de la NADPH oxidasa, p47^{phox} (Figura 23C y 23D) y p22^{phox} (Figura 23E y 23F), en tejidos de aorta de SHR en comparación con WKY. El tratamiento con GW0742 fue capaz de reducir la expresión génica y proteica de ambas subunidades en SHR, pero no en WKY.

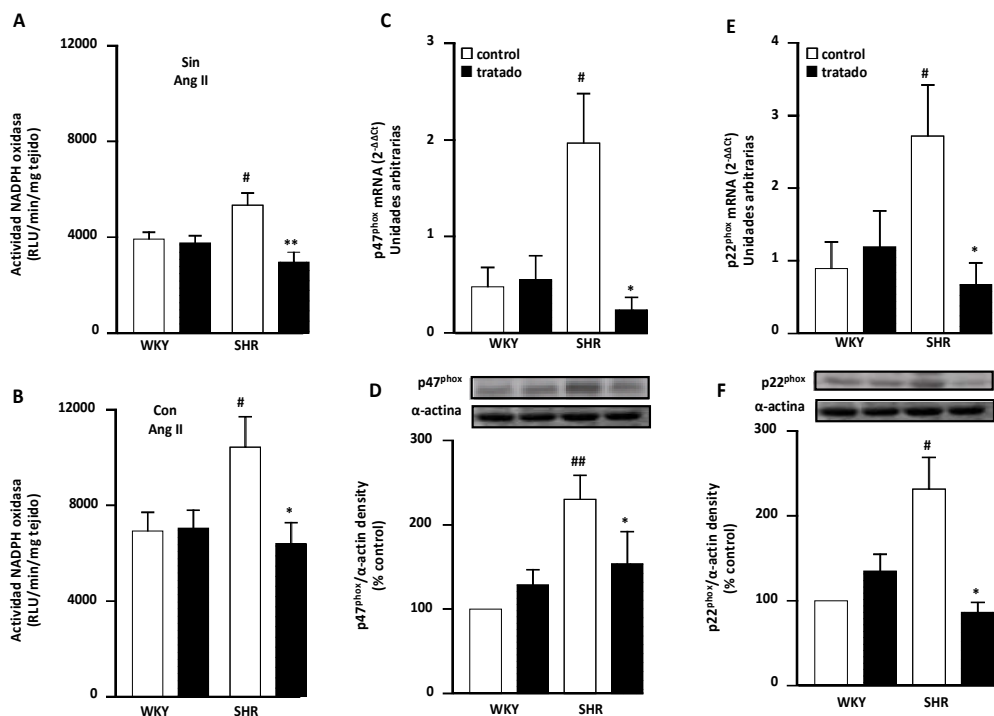


Figura 23. Efectos de GW0742 en la vía de la NADPH oxidasa. La actividad NADPH oxidasa medida con lucigenina por quimiluminiscencia sin (A) y con la presencia de Ang II (1 μ M) (n = 6-10) (B), y la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa, p47^{phox} (C) y p22^{phox} (E) de mRNA por RT-PCR y proteínas por western blot (D y F) en ratas WKY y SHR. Los datos (D y F) se representan como unidades arbitrarias de mRNA (2^{-ΔΔCt}). Se muestran bandas e histogramas que representan valores densitométricos normalizados con α -actina para western blot (E y G) (n = 3 - 5). # P < 0,05 y ### P < 0,01 vs WKY control. * P < 0,05 y ** P < 0,01 vs SHR control.

2.5. GW0742 redujo la respuesta inflamatoria vascular en SHR.

La expresión del mRNA de citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 o TNF- α y moléculas de adhesión intercelular, ICAM-1, en homogenados aórticos fue mayor

en SHR en comparación a las WKY (Figura 24). En SHR, GW0742 disminuyó significativamente la expresión de estos genes.

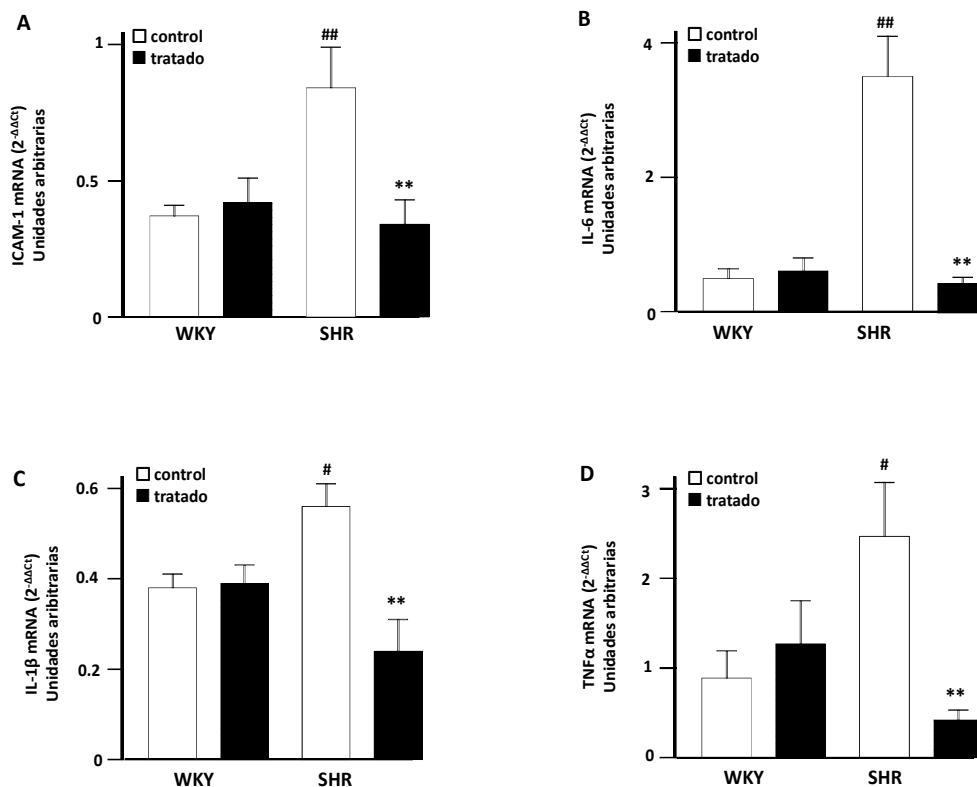


Figura 24. Efectos de GW0742 en la expresión mRNA de genes proinflamatorios. Niveles de mRNA de ICAM-1 (A), IL-6 (B), IL-1 β (C) y TNF- α (D), en aortas SHR y WKY. Los datos se presentan como una relación de unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Los resultados se mostraron como la media \pm SEM ($n = 10-15$ experimentos). [#] $P < 0,05$ y ^{##} $P < 0,01$ vs WKY control. ^{**} $P < 0,01$ vs SHR control.

2.6. GW0742 regula la fosforilación de ERK1/2 y de AKT en aorta.

La expresión proteica de fosfo-ERK1/2 y fosfo-AKT aumentó y disminuyó, respectivamente, en aortas de SHR control en comparación con las ratas WKY control. El tratamiento crónico con GW0742 redujo la fosforilación de ERK1/2 y aumentó la de AKT (Figura 25) en SHR, sin afectar a las ratas WKY.

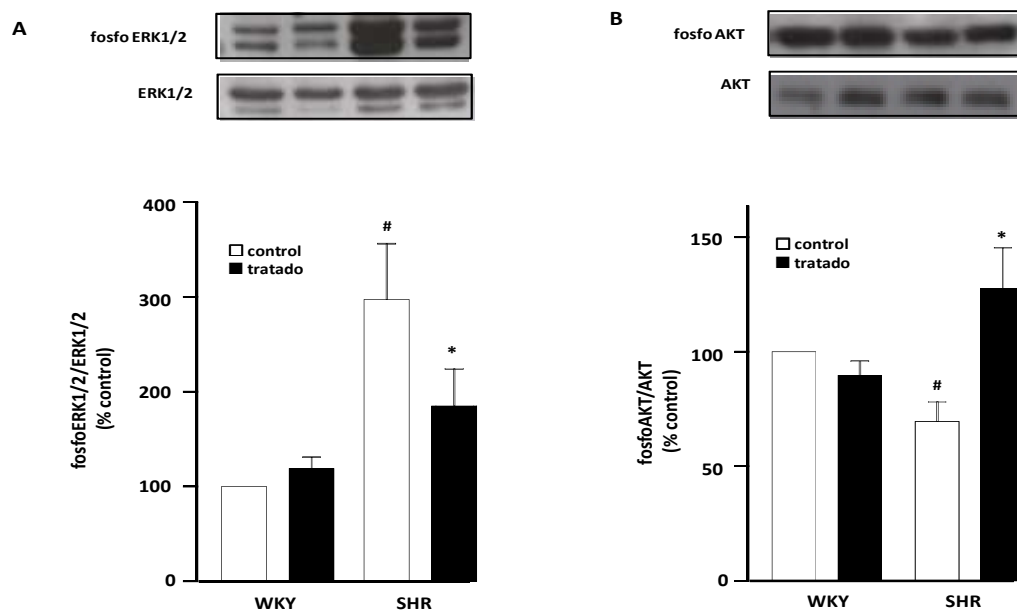


Figura 25. Efectos de GW0742 sobre las vías de ERK y AKT. Los paneles (A y B) muestran bandas e histogramas que representan fosfo-ERK1/2 y fosfo-AKT en relación al total de los niveles de ERK1/2 y AKT ($n = 3-5$). [#] $P < 0,05$ vs WKY control. ^{*} $P < 0,05$ vs SHR control.

2.7. GW0742 aumenta la expresión de reguladores de la señal del receptor acoplado a proteínas G (RGS) en aorta.

Para determinar si PPAR β regula los componentes de la señalización del receptor vasoactivo y de quimiocinas examinamos los efectos de GW0742 en la expresión aórtica de los dos reguladores de la señal del receptor acoplado a proteínas G, RGS4 y RGS5. Los anillos de aorta de SHR control mostraron una expresión reducida de RGS4 (Figura 26A) y RGS5 (Figura 26B), en comparación con las ratas normotensas. El tratamiento con GW0742 aumentó significativamente la expresión de ambas proteínas en las dos cepas de ratas.

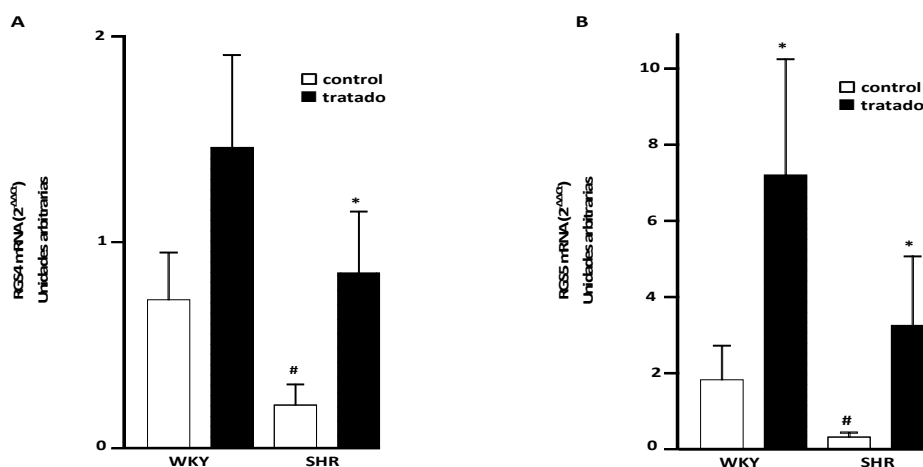


Figura 26. Efectos de GW0742 sobre la expresión de mRNA de las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS, regulators G protein signaling). Los niveles de mRNA de RGS4 (A) y RGS5 (B) en aortas SHR y WKY. Los datos se presentaron como una proporción de unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 11-13$ experimentos). $### P < 0,01$ vs WKY control. $* P < 0,05$ y $** P < 0,01$ vs SHR control.

2.8. Efectos *in vitro* del ligando PPAR β sobre la contractilidad y la actividad NADPH oxidasa en aorta.

Para profundizar en el análisis de los mecanismos de la activación PPAR β en la función vascular, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los anillos aórticos incubados *in vitro* con GW0742 (10^{-6} M) durante 6 h (Figura 27). El ligando PPAR β no tuvo efecto sobre las respuestas contráctiles inducidas por KCl o Phe. Sin embargo, presentó un fuerte efecto inhibitorio sobre la contracción inducida por Ang II y una inhibición parcial de la contracción a ET-1. Curiosamente, estos efectos fueron suprimidos por el antagonista PPAR β , GSK0660.

Además la actividad NADPH oxidasa fue aumentada de forma significativa por la Ang II (10^{-6} M). Este incremento se suprimió en los anillos incubados

durante 6 h con GW0742 (10^{-6} M) y se restauró por la coincubación con el antagonista PPAR β , GSK0660 (10^{-6} M) (Figura 28).

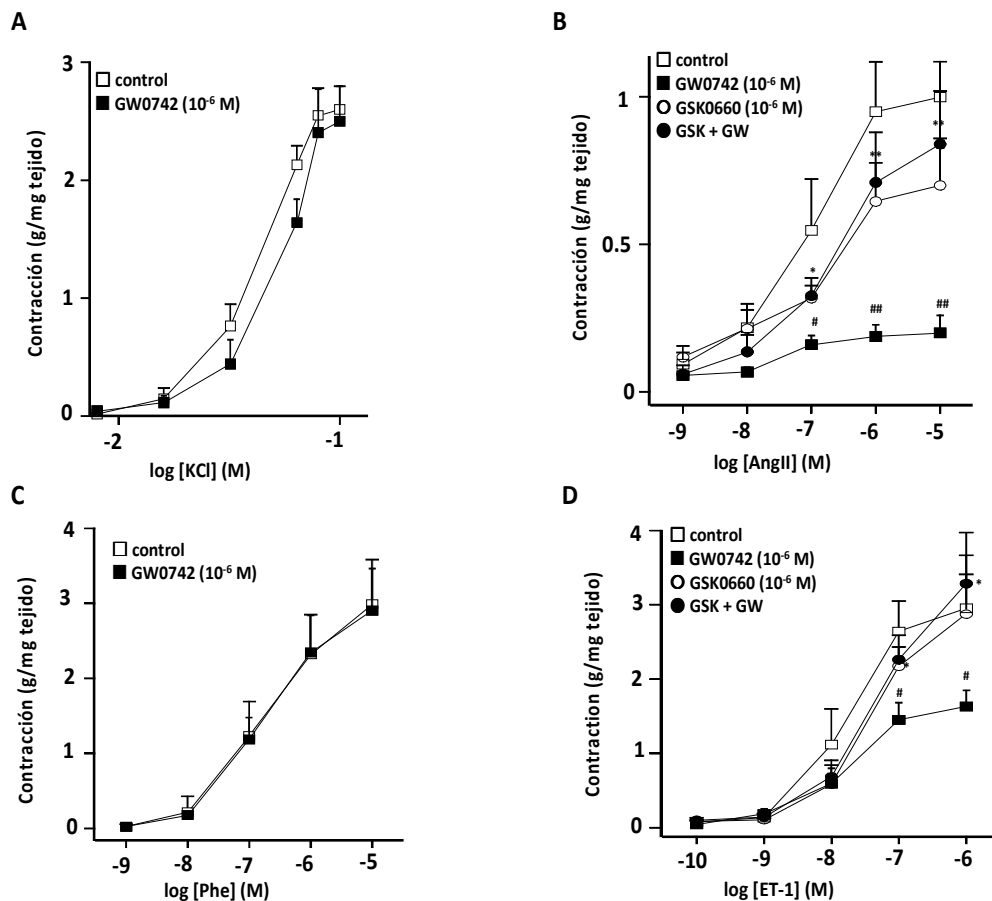


Figura 27. Efectos *in vitro* de GW0742 en respuesta a vasoconstrictores. Curvas de concentración-respuesta a KCl (A), Ang II (B), Phe (C) y ET-1 (D). Anillos aórticos aislados de ratas Wistar con endotelio intacto se incubaron durante 6 horas con o sin GW0742 (10^{-6} M) y con o sin previa incubación (1 h) con el antagonista PPAR β , GSK0660 (10^{-6} M). Las respuestas contráctiles se expresaron como porcentaje de control KCl (80 mM) con la respuesta obtenida de la incubación previa con el agonista PPAR β . Los resultados se mostraron como la media \pm SEM ($n = 4-7$ anillos). # $P < 0,05$ y ### $P < 0,01$ vs anillos del control. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs anillos que se incubaron con GW0742.

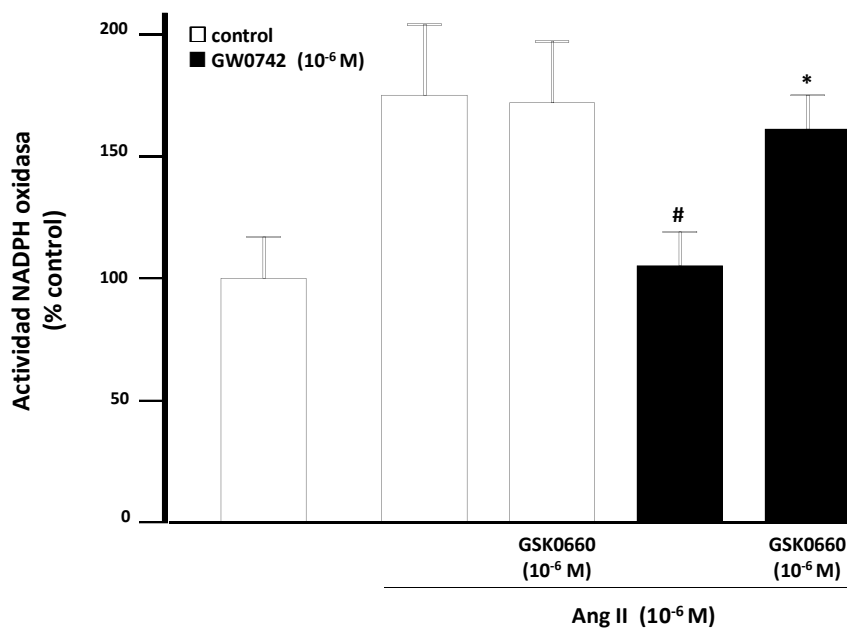


Figura 28. Efectos *in vitro* de GW0742 sobre la actividad NADPH oxidasa. La actividad NADPH oxidasa fue medida por quimioluminiscencia en anillos aórticos aislados de ratas Wistar con endotelio intacto, que se incubaron durante 6 horas con o sin GW0742 (10^{-6} M) y con o sin previa incubación (1 h) con el antagonista PPAR β , GSK0660 (10^{-6} M) y los últimos 5 min con Ang II (10^{-6} M). Los resultados se mostraron como la media \pm SEM ($n = 6-8$ anillos). # $P < 0,05$ vs anillos del control con Ang II. * $P < 0,05$ vs anillos que se incubaron con GW0742 y Ang II.

Como se ha observado *in vivo*, GW0742 aumentó la expresión de RGS4 y RGS5 en aorta, y este efecto fue disminuido por GSK0660 (Figura 29C y 29D). No se observaron cambios significativos en los niveles de mRNA del receptor AT $_1$ ni del receptor ET $_A$ (Figura 29A y 29B).

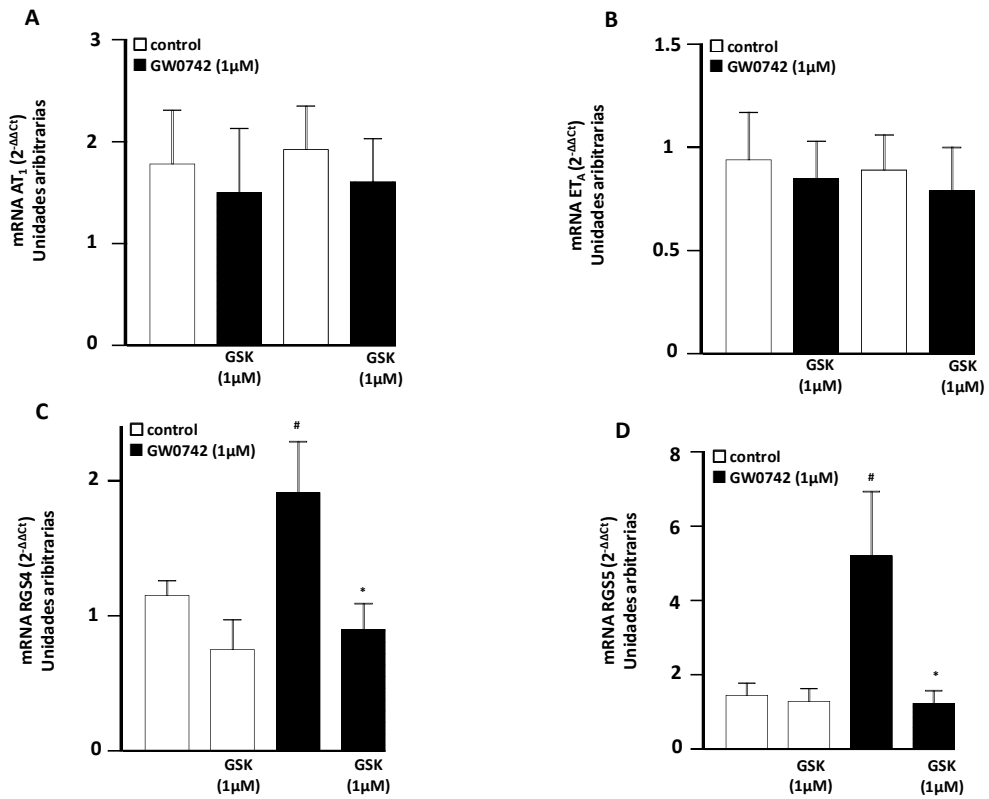


Figura 29. Efectos *in vitro* de GW0742 en la expresión de mRNA de AT₁ (A) y ET_A (B) y de RGS4 (C) y RGS5 (D) en aortas de cada grupo. Los datos se presentaron en una proporción de unidades arbitrarias de mRNA (2^{-ΔΔCt}). Los resultados se mostraron como la media ± SEM (n = 14-22 anillos). # P < 0,05 y ## P < 0,01 vs anillos del control. * P < 0,05 y ** P < 0,01 vs anillos que se incubaron con GW0742.

B. Experimento II: Efectos de GW0742 sobre la hipertensión en ratas DOCA-sal.

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

Las ratas que recibieron DOCA-sal mostraron un aumento progresivo de la PAS, en comparación con los animales del grupo control (Figura 30A). Este aumento fue significativo ($P < 0,05$) a partir de la primera semana, alcanzando una diferencia de aproximadamente 44 mmHg al final del tratamiento. El tratamiento crónico con 5 y 20 mg/Kg de GW0742 previene ($P < 0,01$), de una manera dosis-dependiente, el aumento de la PAS (alrededor del 61 y el 100%, respectivamente) en ratas DOCA-sal tratadas a partir de la segunda semana, sin provocar efecto en los animales control.

Al final del experimento se redujo la frecuencia cardíaca (aproximadamente un 9 %, $P < 0,05$ vs ratas control no tratadas) en el grupo DOCA-sal, en comparación con el grupo control (Figura 30B), y no fue modificada por las dos dosis de GW0742.

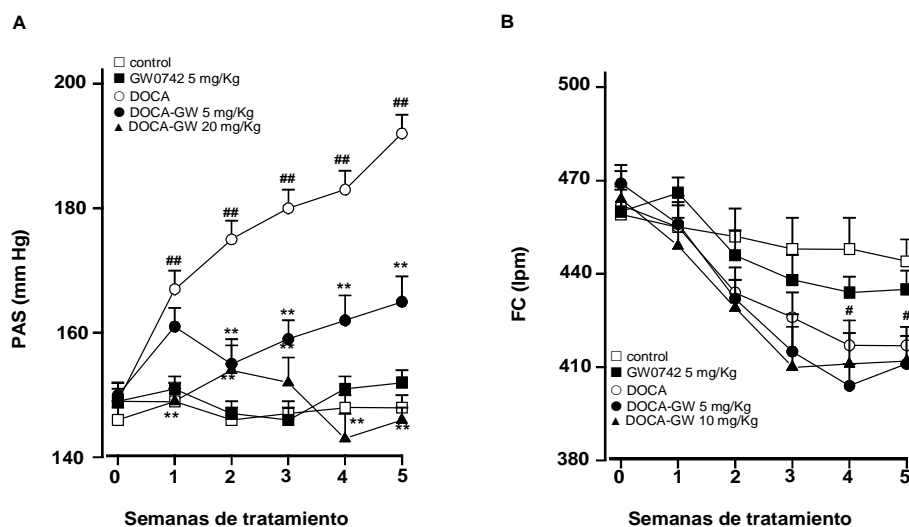


Figura 30. Efectos de la administración crónica de GW0742 sobre la presión arterial sistólica (A) y la frecuencia cardíaca (B), medida por pletismografía. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-20$). # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ vs Wistar control. ** $P < 0,01$ vs DOCA control.

El peso corporal (PC) se incrementó más en el grupo control que en el grupo DOCA-sal después de 5 semanas (144 ± 6 % y 100 ± 6 %, respectivamente, $P < 0,01$). Este mayor incremento fue acompañado también con aumento del peso absoluto de grasa visceral y del peso relativo al PC. El tratamiento con GW0742 no modificó la ganancia de peso corporal ni el peso de la grasa visceral, en control ni en el grupo DOCA-sal (Tabla 6). Estos efectos en el grupo DOCA-sal parecen estar relacionados con una menor ingesta de alimentos (26 ± 2 y 22 ± 2 g/día, en el grupo control y el DOCA-sal, respectivamente, $P < 0,05$), y tampoco se vieron afectados por GW0742. El peso absoluto del ventrículo izquierdo (PVI) y la relación PVI/PC o el peso del corazón (PCo) y riñón (PR) en relación al PC fueron mayores en el grupo DOCA-sal en comparación con el grupo control. La dosis de GW0742 de 5 mg/Kg no modificó estas variables morfológicas, tanto en

el grupo control como en el grupo DOCA-sal. Sin embargo, con 20 mg/Kg se redujeron significativamente los parámetros de hipertrofia cardíaca, pero no PR/PC en ratas DOCA-sal (Tabla 6).

Tabla 6. Peso corporal y de los órganos e índices cardíaco y renal.

| | Wistar-control | Wistar-tratado | DOCA-control | DOCA-5mg/Kg | DOCA-20mg/Kg |
|-----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| PC (g) | 361 ± 8 | 360 ± 8 | 310 ± 10** | 291 ± 9** | 331 ± 12** |
| PCo (mg) | 912 ± 19 | 935 ± 19 | 1080 ± 35** | 1035 ± 39** | 975 ± 35 |
| PVI (mg) | 665 ± 14 | 685 ± 16 | 837 ± 31** | 789 ± 32** | 724 ± 26# |
| PR (mg) | 924 ± 14 | 969 ± 23 | 1675 ± 81** | 1602 ± 46** | 1627 ± 23** |
| GV (g) | 5,4 ± 0,4 | 5,4 ± 0,4 | 2,4 ± 0,3** | 2,4 ± 0,3** | 2,6 ± 0,4* |
| PCo/PC | 2,53 ± 0,05 | 2,61 ± 0,05 | 3,50 ± 0,10** | 3,58 ± 0,11** | 2,96 ± 0,10## |
| PVI/PC | 1,85 ± 0,05 | 1,91 ± 0,04 | 2,71 ± 0,08** | 2,73 ± 0,10** | 2,19 ± 0,07## |
| PR/PC | 0,73 ± 0,01 | 0,73 ± 0,01 | 0,77 ± 0,01** | 0,76 ± 0,01* | 0,74 ± 0,01## |
| PVI/PCo | 2,57 ± 0,05 | 2,70 ± 0,05 | 5,41 ± 0,21** | 5,53 ± 0,11** | 4,96 ± 0,17** |
| GV/PC | 14,7 ± 1,0 | 14,8 ± 0,9 | 7,4 ± 0,7* | 7,7 ± 0,9* | 7,8 ± 1,2* |

PC, peso corporal; PCo, peso del corazón; PVI, peso del ventrículo izquierdo; PR, peso del riñón; GV, grasa visceral. Los valores se expresaron como la media ± SEM (n = 8-20). ## P < 0,01 vs DOCA; * P < 0,05 y ** P < 0,01 vs Wistar control.

Los niveles plasmáticos de MDA (Figura 31A), marcador de la peroxidación lipídica inducida por ROS, y la excreción urinaria a las 24 h de iso-PGF_{2α} (Figura 31B), un marcador más específico de la peroxidación lipídica, se incrementaron en el grupo DOCA-sal, en comparación con el grupo control. El tratamiento con 20 mg/Kg de GW0742, redujo tanto los niveles de MDA como de iso-PGF_{2α}.

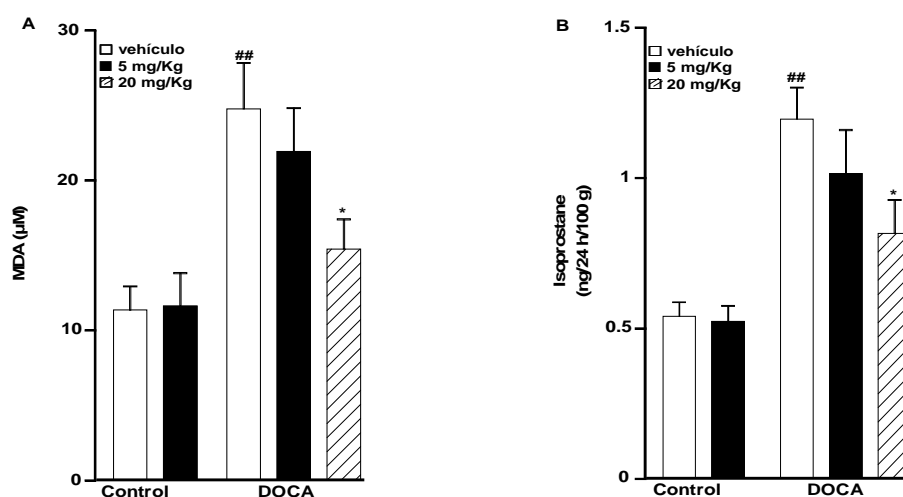


Figura 31. Efectos de GW0742 sobre el contenido plasmático de MDA y la excreción urinaria de iso-PGF_{2α}. Los valores se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-20$). [#] $P < 0,05$ vs Wistar control. ^{*} $P < 0,05$ vs DOCA control.

2.10. Efectos de GW0742 sobre los genes diana de PPAR β en la aorta.

La expresión del gen de PPAR β fue significativamente mayor en la aorta (Figura 32) del grupo DOCA-sal, en comparación con las ratas control. El tratamiento crónico con GW0742 con ambas dosis restauró estos cambios de PPAR β en DOCA-sal a niveles encontrados en el grupo control. En anillos aórticos de DOCA-sal los niveles de mRNA de un conocido gen diana de PPAR β , PDK4 (Figura 32B) fueron similares a los encontrados en las ratas

control. Como era de esperar, el agonista PPAR β aumentó de manera significativa los niveles de mRNA de PDK4 de una manera dosis-dependiente.

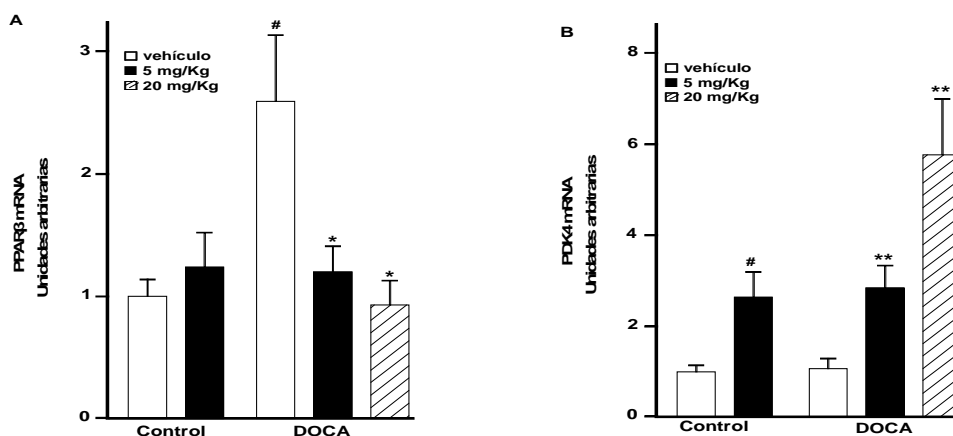


Figura 32. Efectos de GW0742 en genes diana PPAR β en aorta. La expresión de mRNA de PPAR β (A) y PDK4 (B) en aortas de ratas DOCA y Wistar. Los datos se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) en relación al grupo control no tratado. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-16$ experimentos). # $P < 0,05$ vs Wistar control. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs DOCA.

2.11. GW0742 mejora la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal.

Anillos de aorta de ratas DOCA-sal mostraron una reducción de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a ACh en las arterias precontraídas con Phe en comparación a los anillos del grupo control ($E_{max} = 52 \pm 6 \%$ vs $80 \pm 5 \%$, respectivamente, $P < 0,01$) (Figura 33A). La dosis de 5 mg/Kg de GW0742 no produjo un aumento significativo en la relajación inducida por ACh ni en las ratas DOCA-sal ($E_{max} = 52 \pm 7 \%$) ni en las ratas control ($E_{max} = 72 \pm 5 \%$). Sin embargo, con 20 mg/Kg se restauró la máxima relajación a ACh ($E_{max} = 81 \pm 4 \%$) en el grupo DOCA-sal hasta valores encontrados en las ratas control. No se observó diferencia entre los grupos en la respuesta vasodilatadora independiente

de endotelio al NPS en los vasos precontraídos con Phe (Figura 33B). Sólo la dosis de 20 mg/Kg, tendía a aumentar la sensibilidad a NPS en ratas DOCA-sal ($pD_2 = 8,26 \pm 0,10$ vs $8,00 \pm 0,11$, tratadas y control, respectivamente, $P > 0,05$).

La expresión génica de eNOS en la aorta no se modificó en ninguno de los grupos experimentales (Figura 33C). La expresión de caveolina-1 no se alteró en el grupo DOCA-sal, en comparación con las ratas control, pero 20 mg/Kg de GW0742 redujeron notablemente los niveles de mRNA de caveolina-1 (Figura 33D).

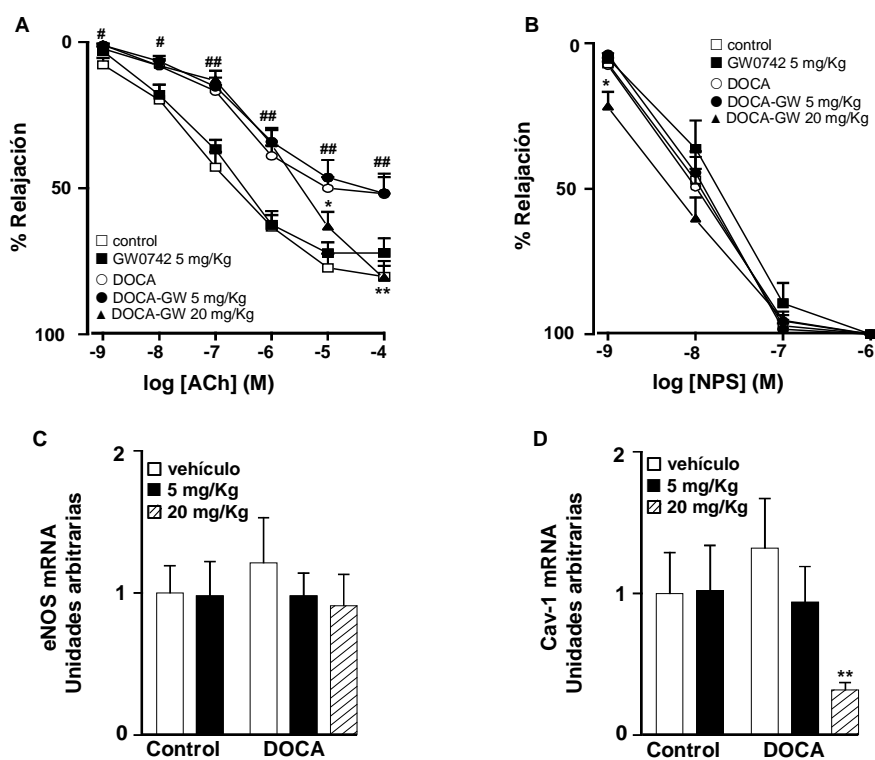


Figura 33. Efectos de GW0742 sobre la función endotelial. Respuestas relajantes vasculares inducidas por ACh (A) y NPS (B) en aortas precontraídas con Phe ($1 \mu M$). La expresión de mRNA de eNOS (C) y caveolina-1 (D) en ratas Wistar y DOCA control y tratadas. Los datos (C y D) se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en relación al grupo control no tratado. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-16$ experimentos). # $P < 0,05$ y ## $P < 0,01$ vs Wistar control. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs DOCA control.

2.12. GW0742 redujo la producción de ROS vasculares en DOCA-sal al reducir la actividad NADPH oxidasa.

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 34A). 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 DOCA-sal mostraron un marcado aumento en la tinción de la adventicia, media y las células endoteliales, en comparación con las ratas WKY y se redujo significativamente por GW0742, sólo en DOCA-sal tratadas con 20 mg/Kg (Figura 34A y 34B).

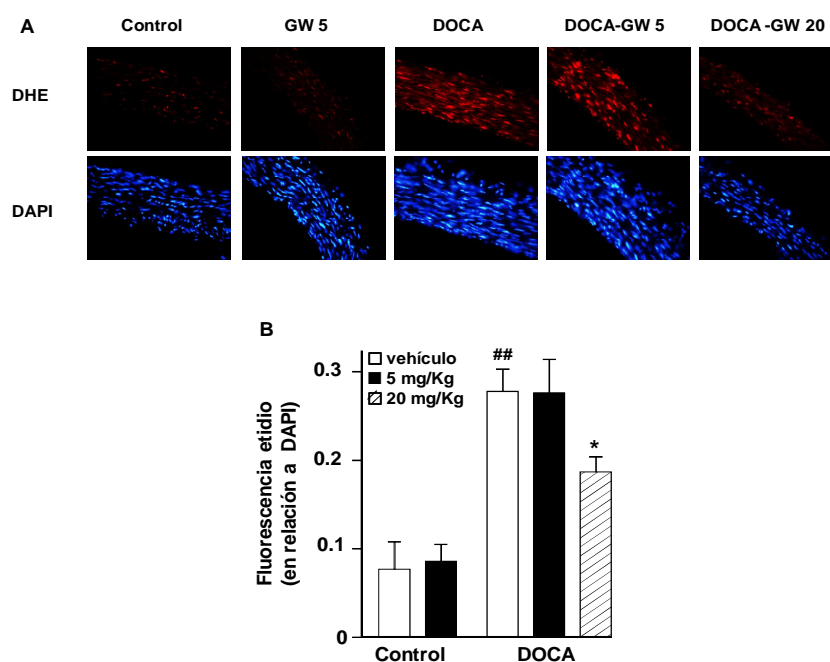


Figura 34. Efectos de GW0742 en la producción de O_2^- (B). Las imágenes de arriba muestran las arterias que se incubaron en presencia de DHE que produce una fluorescencia roja cuando se oxida a etidio por O_2^- . Las de abajo muestran fluorescencia azul de la tinción nuclear con DAPI ($\times 400$ aumentos) (A). El promedio de los valores se expresó como la media \pm SEM ($n = 5-8$ anillos de diferentes ratas) de la fluorescencia roja de etidio normalizada con el azul fluorescente DAPI. ^{##} $P < 0,01$ vs Wistar control. ^{*} $P < 0,05$ vs DOCA control.

La actividad de la NADPH oxidasa medida por quimioluminiscencia se incrementó en anillos de aorta de ratas DOCA-sal, en comparación con las ratas control (Figura 35A). El tratamiento crónico con GW0742 (20 mg/Kg) redujo significativamente la actividad en ratas DOCA sal, sin producir efecto a la dosis de 5 mg/Kg ni en ratas DOCA-sal, ni en ratas control.

Se observó un aumento en la expresión de mRNA de las subunidades de la NADPH oxidasa, NOX-4 (Figura 35C), p47^{phox} (Figura 35D) y p22^{phox} (Figura 35E) en el tejido aórtico de ratas DOCA-sal, en comparación con las ratas control, sin cambios en NOX-1 (Figura 35B). Una vez más, sólo el tratamiento con GW0742 a la dosis de 20 mg/Kg redujo la expresión génica de la subunidad NOX-4, sin modificar al resto de las subunidades de la NADPH oxidasa.

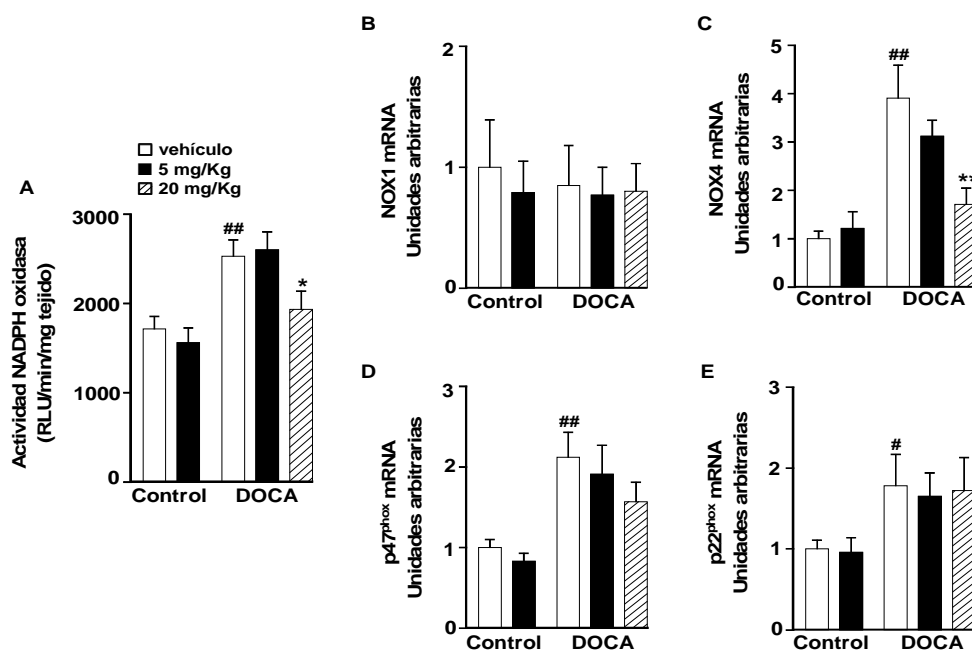


Figura 35. Efectos de GW0742 en la vía de la NADPH oxidasa. La actividad NADPH oxidasa medida con lucigenina por quimioluminiscencia (A) y la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa, NOX-1 (B), NOX-4 (C), p47^{phox} (D) y p22^{phox} (E) de mRNA en ratas Wistar y DOCA. Los datos (D y E) se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en relación al grupo control no tratado. (n = 8 - 16). # P < 0,05 y ## P < 0,01 vs Wistar control. * P < 0,05 y ** P < 0,01 vs DOCA control.

2.13. Efectos de GW0742 en la síntesis de ET-1.

La ET-1 juega un papel importante en la disfunción endotelial observada en la hipertensión por mineralocorticoides. 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 en la aorta se incrementó en ratas DOCA-sal, en comparación con las ratas control (Figura 36A), sin cambios en la expresión de los receptores ET_A (Figura 36B). Este aumento de preproET-1 vascular se acompañó de un aumento de ET-1 en plasma (Figura 36C). El tratamiento crónico con GW0742 (5 mg/Kg) no modificó el mRNA aórtico de preproET-1 ni los niveles de ET-1 en plasma, tanto en las ratas DOCA-sal como en las ratas control. Sin embargo, la dosis más alta aumentó la expresión de preproET-1 en ratas DOCA-sal, sin afectar a la expresión del receptor ET_A.

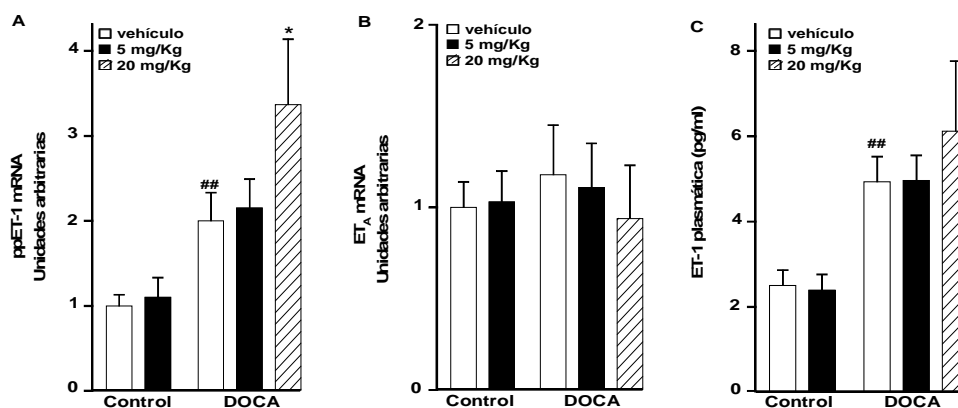


Figura 36. Efectos de GW0742 en la síntesis de ET-1. La expresión de mRNA de preproET-1 (A) y ET_A (B) y los niveles plasmáticos de ET-1 (C) en aortas de ratas DOCA y Wistar. Los datos (A y B) se representan como unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en relación al grupo control no tratado. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM (n = 8-16 experimentos). ## P < 0,01 vs Wistar control. * P < 0,05 vs DOCA.

2.14. GW0742 aumentó los reguladores de la señal del receptor acoplado a proteínas G (RGS) en aorta.

Para determinar si PPAR β regula la señalización de sustancias vasoactivas, como ET-1, y del receptor de quimioquinas, se examinaron los efectos de GW0742 en la expresión aórtica del regulador de la señalización de receptores acoplados a proteínas G. Anillos de aorta del grupo DOCA-sal mostraron una menor expresión de RGS5 (Figura 37), en comparación con la ratas normotensas. El tratamiento con GW0742 (20 mg/Kg) aumentó significativamente la expresión de RGS5 en las ratas DOCA-sal.

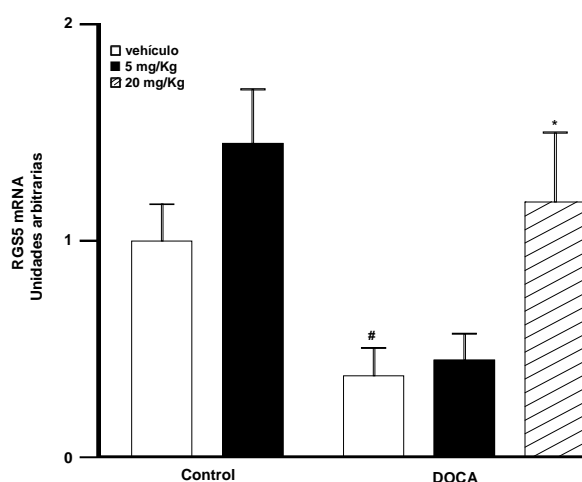


Figura 37. Efectos de GW0742 sobre la expresión de mRNA de las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS, regulators G protein signaling). Los niveles de mRNA de RGS5 (B) en aortas DOCA y Wistar. Los datos se presentaron como una proporción de unidades arbitrarias de mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) en relación al grupo control no tratado. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-16$ experimentos). # $P < 0,05$ vs Wistar control. * $P < 0,05$ vs DOCA control.

2.15. GW0742 mejora la disfunción endotelial aórtica *in vitro* inducida por ET-1.

A fin de analizar el efecto de la activación PPAR β en la señalización de ET-1 en la pared vascular, probamos si GW0742 mejora la disfunción endotelial inducida por la ET-1 en anillos de aorta que se incubaron *in vitro* con ET-1 (10 nM) durante 4 h. En estas condiciones experimentales, ET-1 reduce la respuesta relajante a ACh en anillos precontraídos con Phe (Figura 38A). La coincubación con GW0742 (10 μ M) restauró la respuesta relajante a la ACh en valores similares a los que se encuentra en los anillos control. Curiosamente, este efecto preventivo fue abolido por el antagonista PPAR β , GSK0660 (Figura 38B).

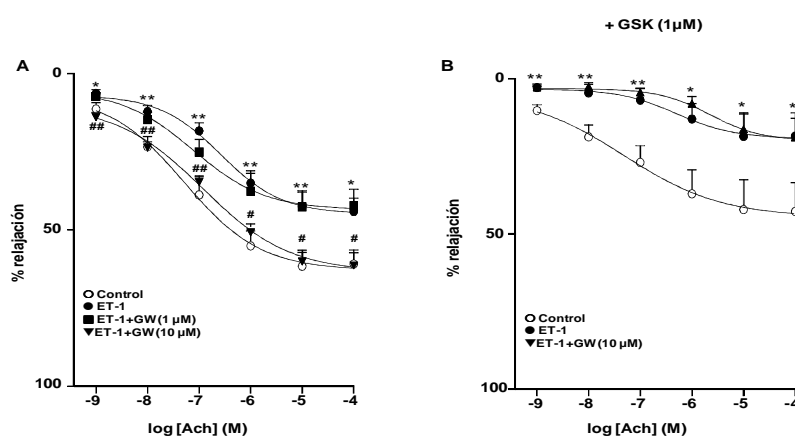


Figura 38. Efectos de GW0742 sobre la disfunción endotelial *in vitro* inducida por ET-1. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 8-16$ experimentos). # $P < 0,05$ y ### $P < 0,01$ vs ET-1. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs control.

2.16. GW0742 indujo respuestas vasodilatadoras *in vitro* en arteria mesentérica aislada de rata.

GW0742 originó, de una manera dependiente de la concentración (1, 10, 30 μM), una progresiva disminución de la curva concentración-respuesta contráctil a la Phe (Figura 39A). El incremento acumulativo de la concentración de GW0742 (10^{-7} - 10^{-4} M) en las pequeñas arterias mesentéricas precontraídas con Phe dio lugar a una relajación dependiente de la concentración, siendo IC_{50} $4,3 \pm 1 \mu\text{M}$ (Figura 39B). Esta relajación no se alteró ni por la inhibición de la eNOS con L-NAME, ni por la incubación con el antagonista $\text{PPAR}\beta$, GSK0660.

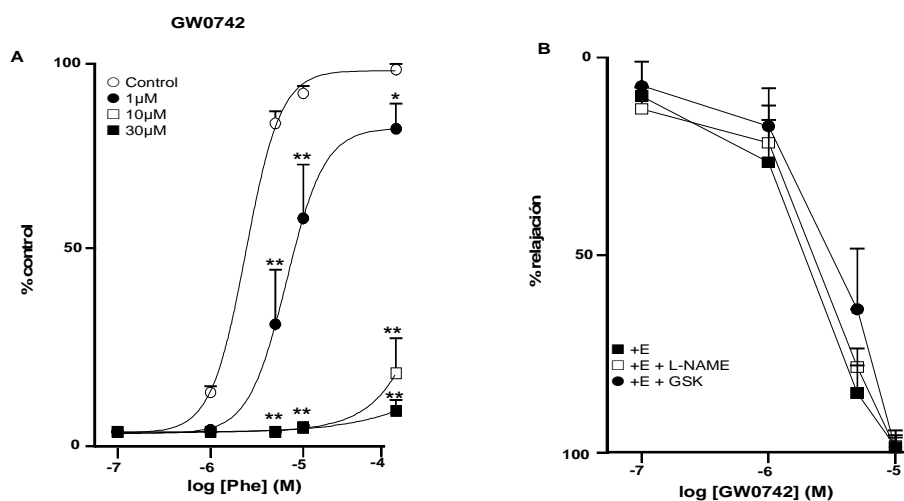


Figura 39. Efectos vasodilatadores *in vitro* de GW0742 en arterias mesentéricas. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM ($n = 5-7$ experimentos). * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ vs control.

Discusión.

Discusión

1. Efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β .

En este trabajo de Tesis Doctoral describimos, por primera vez, que los agonistas de PPAR β inducen una respuesta vasodilatadora parcialmente dependiente de endotelio y NO en anillos aislados de aorta de rata. Las relajaciones dependientes de endotelio inducidas por estos agonistas son calcio-independientes y sensibles a la inhibición de PI3K y al bloqueo de PPAR β . En HUVECs, estos agonistas inducen la producción de NO y la fosforilación de AKT-dependiente de PI3K y de eNOS.

1.1. Papel de los PPAR β .

L165041 y GW0742 son agonistas específicos de PPAR β (Berger *et al.*, 1999; Sznajdman *et al.*, 2003). En el desarrollo de este estudio, las concentraciones que se han empleado entran dentro del rango esperado de concentraciones terapéuticas (micromolar, Takata *et al.*, 2005), a las cuales se comportan como activadores efectivos de PPAR β . Ambos agonistas producen un efecto relajante con un perfil farmacológico similar y el mismo mecanismo de acción. Es importante destacar que L165041 y GW0742 pertenecen a diferentes clases químicas. El bloqueo de PPAR β con el antagonista selectivo, GSK0660, inhibió tanto el efecto relajante como la producción de NO endotelial inducida por los agonistas PPAR β . Por tanto, estos resultados sugieren que los efectos de L165041 y GW0742 se deben a la activación de PPAR β . Aunque, somos conscientes que las concentraciones utilizadas son de 100-1000 veces mayores que los valores de K_i para la unión del ligando al receptor PPAR β (Berger *et al.*, 1999; Sznajdman *et*

al., 2003). Sin embargo, en la gran mayoría de los estudios publicados con estos dos agonistas se requieren concentraciones de 1 μM o más altas para observar efectos dependientes de PPAR β (ya sean genómicos o no genómicos). Por tanto, se necesitarían más estudios para analizar las razones de esta discrepancia y/o identificar otros receptores potenciales o subtipos de receptores implicados.

El efecto vasodilatador parece ser independiente de la activación de PPAR γ , ya que la coincubación con su antagonista GW9662 no lo inhibió. De igual forma, el agonista de PPAR α , clofibrato, a concentraciones no superiores a 100 μM , no presentó efecto vasodilatador; sugiriendo que los efectos observados por L165041 y GW0742 son independientes de la activación de PPAR α .

La respuesta vascular independiente de endotelio, observada a las concentraciones más altas de los agonistas, no se vio afectada por el bloqueo de PPAR β , sugiriendo la implicación de otras vías independientes a la activación de PPAR β .

Recientemente se ha descrito que la localización de PPAR β no se limita al núcleo (Kelly *et al.*, 2004). Se sabe que estos receptores se expresan en CMLV, así como en células endoteliales (Kliwer *et al.*, 1994; Piqueras *et al.*, 2009). Nosotros hemos encontrado que la respuesta vasodilatadora máxima, a cada concentración de agonista, se alcanza a los 15 minutos, lo que sugiere que el efecto es independiente de los procesos nucleares, ya que no habría suficiente tiempo para la transcripción de genes. Estos resultados demuestran por primera vez un efecto rápido, no genómico, de los agonistas PPAR β en el lecho vascular. De igual forma, Ali y colaboradores (2006) demostraron la existencia de estos receptores en células no nucleadas, plaquetas, y que su rápida activación por los agonistas (5 min) producía la inhibición de la agregación plaquetaria.

1.2. Papel del endotelio y del NO.

El endotelio vascular desempeña un papel importante en el control del tono vascular a través de la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores (Vanhoutte *et al.*, 1986). Se sabe que el NO es el vasodilatador más importante liberado por el endotelio y, en algunos vasos tales como la aorta de rata, la vasodilatación dependiente de endotelio es casi por completo debida a la liberación de NO (Nagao y Vanhoutte, 1992). Los resultados de nuestro estudio muestran que la eliminación mecánica del endotelio o la incubación con el inhibidor de la eNOS, L-NAME, reduce significativamente el efecto vasodilatador de los dos agonistas en vasos precontraídos con Phe, lo que indica que estos agentes requieren la presencia de endotelio funcional y NO para ejercer su respuesta vasodilatadora máxima.

Por otra parte, los agonistas PPAR β aumentaron la producción de NO en HUVECs. En condiciones normales de estrés oxidativo, como es el caso de nuestros experimentos, la relajación vascular dependiente de endotelio puede estar mediada por:

- i) Un aumento de la producción de NO endotelial.
- ii) La potenciación de la vía del NO-cGMP que conduce a una vasodilatación. Este mecanismo fue descartado ya que ni L165041 ni GW0742 modificaron la respuesta relajante inducida por el donador de NO, NPS, en anillos sin endotelio.

El NO se forma en el endotelio a través de la conversión metabólica de L-arginina en L-citrulina, reacción catalizada por la eNOS. La activación de eNOS es generalmente un proceso calcio-dependiente (Stuehr, 1997). El aumento de la concentración de calcio intracelular libre, permite la unión de calcio-calmodulina a la eNOS, desplazando a la caveolina-1 y activando la eNOS. En nuestro estudio, observamos que los agonistas PPAR β inducían una vasodilatación dependiente

de endotelio, independientemente de los cambios en la concentración de calcio intracelular, ya que la eliminación de calcio extracelular o bien la incubación con el quelante de calcio intracelular, BAPTA, no alteraron el efecto relajante. También se sabe que la insulina, los estrógenos y las fuerzas de cizallamiento activan a la eNOS por una vía independiente de calcio. Estos agentes provocan la activación de la eNOS a través de la vía PI3K/AKT, que recientemente se ha demostrado que fosforila la eNOS y altera su sensibilidad al calcio, por lo que es activa a concentraciones subfisiológicas (Hartell *et al.*, 2005). La incubación de los anillos de aorta con el inhibidor de PI3K, LY-294002, disminuyó significativamente la respuesta relajante inducida por ambos agonistas de PPAR β . Estos resultados sugieren que estos agentes podrían activar eNOS por una vía sensible a PI3K e independiente de calcio. Además, en HUVECs observamos un aumento de la fosforilación de AKT y eNOS a los 15 minutos, y esta fosforilación se inhibió por el inhibidor de PI3K, LY-294002, demostrando que la activación de eNOS inducida por estos agonistas está mediada por la activación de la vía PI3K/AKT.

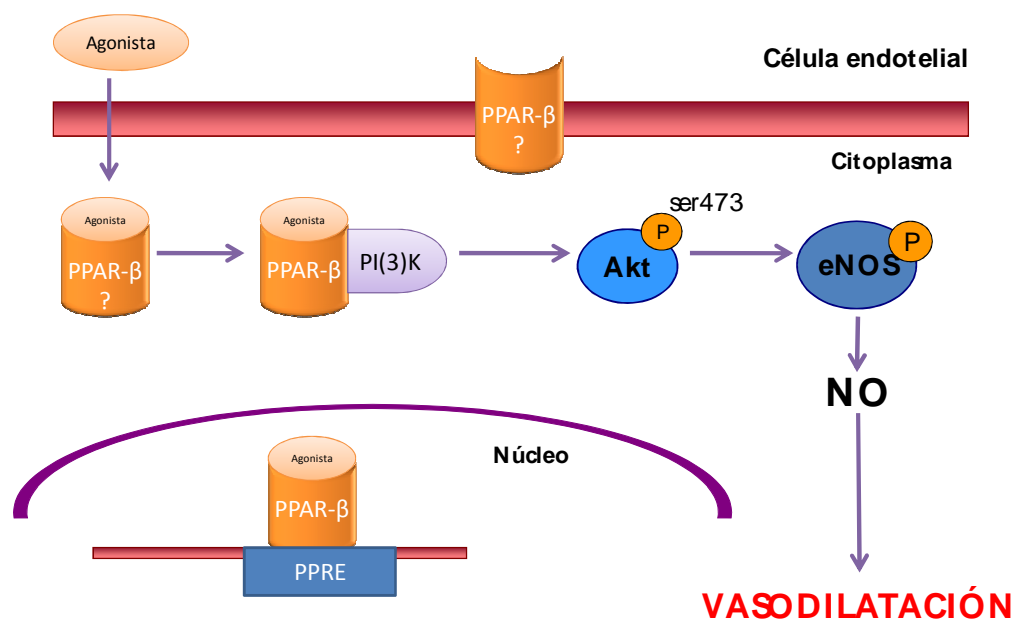


Figura 40. Esquema representativo del efecto vasodilatador dependiente de endotelio de los agonistas PPAR β . El efecto dependiente de endotelio está relacionado con la fosforilación de eNOS por activación de la vía PI3K/AKT.

Asimismo, en HUVECs la producción de NO inducida por los agonistas PPAR β fue sensible a la inhibición de PI3K. Estos datos apoyan resultados previos realizados en células progenitoras endoteliales, donde se describe que los agonistas PPAR β activan la vía PI3K/AKT en pocos minutos a través de la activación de PPAR β (Han *et al.*, 2008).

1.3. Papel del músculo liso vascular.

Es importante señalar que estos compuestos podrían modificar el tono vascular, actuando tanto sobre la capa de células endoteliales como la de las

células del músculo liso vascular, ya que a concentraciones elevadas, inhiben la respuesta contráctil inducida por Phe o U46619 en aortas sin endotelio. El bloqueo de PPAR β con el antagonista GSK0660 no alteró la respuesta vasodilatadora de ambos agonistas en anillos de aorta sin endotelio precontraídos con Phe, lo que sugiere que estos efectos relajantes son independientes de la activación del receptor. Las altas concentraciones de estos agonistas PPAR β podrían inhibir directamente el aparato contráctil o la señalización inducida por los agentes vasoconstrictores en el músculo vascular. Análisis posteriores de la relajación independiente de endotelio inducida por los agonistas PPAR β indicó que también es independiente de calcio extracelular ya que la contracción fásica transitoria inducida por Phe en un medio libre de calcio, producida por la liberación y sensibilización de calcio, se redujo significativamente. Por el contrario, la contracción inducida por KCl, debida principalmente a la entrada de calcio a través de canales voltaje-dependientes, apenas se modificó. Por lo tanto, la relajación independiente de endotelio que se observó a elevadas concentraciones, parece compartir algunas similitudes con los efectos antiagregantes descritos para estos agonistas por Ali y colaboradores (2005), que también fueron asociados a una inhibición de la liberación de calcio en las plaquetas.

En conclusión, nuestro estudio describe por primera vez que los agonistas PPAR β , L165041 y GW0742, producen un efecto rápido en el tejido vascular de rata que conduce a una vasodilatación concentración dependiente. Este efecto parece estar relacionado, en parte, con activación de receptores PPAR β a través de mecanismos no genómicos. La relajación es principalmente dependiente de endotelio y NO y no está relacionada con la clásica vía calcio/calmodulina para la activación de eNOS, sino con su fosforilación por la vía PI3K/AKT. El componente residual independiente de endotelio tampoco se ve afectado por la eliminación de calcio extracelular, y parece no estar relacionado con la activación de PPAR β .

2. Efecto antihipertensor de la activación PPAR β en SHR.

PPAR β se expresa en diversos tejidos y células (Berger y Moller, 2002), sin embargo, su función más allá de sus efectos metabólicos no se conoce demasiado. Recientemente, se han descrito distintas acciones a nivel vascular como la inducción de la proliferación de células endoteliales (Piqueras *et al.*, 2007), angiogénesis (Piqueras *et al.*, 2007), vasculogénesis (Han *et al.*, 2008), inhibición de la proliferación y migración de células de músculo liso vascular (Lim *et al.*, 2009), inhibición de la aterosclerosis acelerada por Ang II (Takata *et al.*, 2008) y la protección de las células endoteliales de la apoptosis inducida por H₂O₂ (Liou *et al.*, 2006). Algunos de estos efectos protectores parecen estar relacionados con la reducción de parámetros metabólicos, tal como triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, glucosa e insulina (Tanaka *et al.*, 2003; 2008).

De acuerdo con los efectos vasodilatadores que describimos para los agonistas PPAR β , pensamos que podrían presentar un efecto antihipertensor. Los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral, aportan la primera evidencia de que el tratamiento *in vivo* con el agonista selectivo GW0742 reduce la presión arterial sistólica, la hipertrofia vascular mesentérica, la inflamación vascular, el estrés oxidativo sistémico y vascular y la disfunción endotelial en SHR. Estos efectos parecen estar relacionados con una activación directa de los PPAR β en la pared vascular. Sin embargo, a pesar de que GW0742 no modificó los niveles plasmáticos de ácidos grasos libres y glucosa, mediadores involucrados en la generación de especies reactivas de oxígeno y de la disfunción endotelial (Inoguchi *et al.*, 2000; Cosentino *et al.*, 2003), el tratamiento con el agonista PPAR β aumentó los niveles de HDL y mejoró la tolerancia a la glucosa en SHR, lo que podría colaborar con los efectos protectores inducidos por GW0742 en la pared vascular.

2.1. Participación de PPAR β en los efectos protectores.

Los efectos inhibitorios del antagonista PPAR β , GSK0660, en los experimentos *in vitro* apoyan el papel de PPAR β en los efectos de GW0742. Sin embargo, a pesar de la selectividad de GW0742 para el PPAR β , no se puede descartar por completo que la activación cruzada de otros PPARs también podría estar implicada en los efectos de este agonista.

En aorta y riñón de animales SHR, la expresión de PPAR β está incrementada en comparación con WKYs. Estos resultados están de acuerdo con los que se han descrito sobre la expresión de PPAR α en SHR (Diep *et al.*, 2001), lo que sugiere que los cambios en la expresión de PPAR pueden desempeñar un papel compensatorio en los vasos sanguíneos y los riñones de SHR, ya que el tratamiento crónico con GW0742 revierte estos cambios. Sin embargo, a pesar del aumento de la expresión del receptor en aorta o riñón, la expresión de sus genes diana estaba disminuida. Esto podría estar relacionado con una escasa captación de ligandos endógenos de PPAR β (por ejemplo, ácidos grasos) en SHR, ya que son animales genéticamente deficientes en CD36, un transportador de membrana de ácidos grasos (Aitman *et al.*, 1999).

Por el contrario, el mRNA de PPAR β y de su gen diana, PDK4, estaba significativamente reducido en los corazones de SHR, lo que está en relación con la reducción de la oxidación de los ácidos grasos durante el desarrollo de hipertrofia cardíaca. GW0742 también revirtió este cambio en el corazón y aumentó el mRNA de PDK4 en ambas cepas de ratas. Los experimentos sobre la expresión proteica y función vascular se llevaron a cabo en la aorta, vaso de conductancia, y podrían presentar ciertas limitaciones relativas a los mecanismos que participan en la disminución de la presión arterial.

2.2. Efectos protectores sobre la morfología y la histología cardíaca, renal y vascular.

La presión arterial elevada de manera sostenida es una de las principales causas en el desarrollo de hipertrofia cardíaca y renal (Frochlich *et al.*, 1993). Además, los vasos de resistencia de pacientes con hipertensión esencial y ratas SHR muestran un remodelado eutrófico interno, lo que significa que la relación media/lumen está incrementada sin existir cambios en la cantidad de materia (Heagerty *et al.*, 1993; Mulvany *et al.*, 1996). El tratamiento crónico con GW0742 redujo significativamente el remodelado vascular en las arterias mesentéricas, sugiriendo que este efecto podría contribuir a reducir la presión sanguínea. La falta de efectos inhibitorios de GW0742 sobre la hipertrofia cardíaca, a pesar de la reducción de la presión arterial, podría explicarse por el hecho que la bajada de presión arterial sistólica no se mantuvo durante el tiempo necesario como para inducir regresión morfológica y por la inducción de crecimiento cardíaco rápido, como se ha descrito previamente en ratones tratados con GW0742 o con otro agonista PPAR β , GW501516 (Wagner *et al.*, 2009), donde se contrarrestan los efectos de la reducción de la presión arterial y de la actividad de la vía de Ang II. Sin embargo, a pesar de la falta de cambios macroscópicos, GW0742 redujo tanto el aumento de diámetro de los cardiomiocitos como la acumulación de colágeno en SHR, indicando que el tratamiento crónico con el agonista previene las consecuencias histopatológicas de la hipertensión, que está en concordancia con la inhibición de la síntesis de colágeno inducida por Ang II en respuesta a la activación PPAR β (Lee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007). Además, el tratamiento crónico con GW0742 redujo la frecuencia cardíaca, factor de riesgo independiente de la morbilidad y mortalidad cardiovascular en pacientes hipertensos (Gillman *et al.*, 2003).

La finalidad de las células del músculo liso vascular es mantener un fenotipo contráctil diferenciado o bien desdiferenciarse hacia un fenotipo proliferativo, lo

que podría venir determinado por el equilibrio entre las vías AKT y ERK (Hayashi *et al.*, 1999). En nuestros estudios hemos encontrado un aumento de la activación de ERK1/2 y una disminución de la fosforilación de AKT en aortas de ratas hipertensas. En distintos tipos celulares se ha descrito la activación de la vía PI3K/AKT por activación de PPAR β (Jimenez *et al.*, 2010; Di-Poï *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con GW0742 aumenta la fosforilación de AKT en aortas de SHR. PPAR β también regula la vía ERK1/2 en los queratinocitos (Burdick *et al.*, 2007), en el tejido adiposo (Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008), en las células cardíacas (Lee *et al.*, 2009) y en las células del músculo liso vascular (Takata *et al.*, 2008). En el presente estudio, el aumento de la fosforilación de ERK1/2 encontrado en SHR se redujo significativamente tras el tratamiento con GW072. El cambio en el equilibrio entre las vías AKT/ERK inducido por este agente, puede participar en la regulación del cambio fenotípico de las células del músculo liso vascular en SHR, conduciendo a una disminución del remodelado vascular. PPAR β inhibe la inflamación del músculo liso vascular y la proliferación a través de la inducción de TGF- β 1 (Kim *et al.*, 2008). En teoría, estos efectos antiproliferativos pueden contribuir a los efectos antihipertensivos de GW0742 y explicar sus efectos en el remodelado de las arterias de resistencia.

2.3. Papel de las ROS en la disfunción endotelial.

El aumento de la producción de aniones superóxido a través de la vía de NADPH oxidasa contribuye al desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial en ratas SHR y en la hipertensión esencial (Grunfeld *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995). Al igual que se ha descrito previamente con los agonistas PPAR α y PPAR γ (Raji *et al.*, 2003; Füllert *et al.*, 2002; Schiffrin *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2002), el tratamiento crónico con GW0742 disminuyó el estrés oxidativo sistémico y

vascular en SHR, redujo la actividad NADPH oxidasa tanto la basal como la estimulada por Ang II y disminuyó la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa, p22^{phox} y p47^{phox}. Como la expresión de p22^{phox} y p47^{phox} está regulada por ERK1/2 en células del músculo liso vascular (Romero *et al.*, 2010; Touyz *et al.*, 2004), es probable que la inhibición de la vía ERK inducida por GW0742 esté involucrada en la disminución de estas subunidades de NADPH oxidasa.

En la aorta de rata, la vasodilatación dependiente del endotelio está mediada casi exclusivamente por la liberación endotelial de NO. GW0742 mejoró la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio a ACh en SHR, sin verse afectada la respuesta de NPS. Estos datos sugieren que GW0742 mejora la función endotelial en SHR mediante el aumento de la biodisponibilidad del NO, sin cambios en la sensibilidad de la vía NO-cGMP. Varios mecanismos podrían estar involucrados en este efecto, incluyendo un aumento en la expresión de eNOS, una disminución de su regulador alostérico negativo, caveolina-1, y una reducción de los niveles de O₂⁻ vascular y, por tanto, la reducción de la inactivación de NO por O₂⁻. Además, el aumento de la vasoconstricción inducida por Ang II en SHR se redujo significativamente por la activación PPAR β , posiblemente por la restauración de la expresión de RGS.

2.4. Efectos sobre la inflamación vascular.

La inflamación vascular juega un papel crucial en la progresión del daño vascular asociado a la hipertensión y es el enlace entre la presión arterial elevada y la aterosclerosis. Se sabe que la activación de ERK1/2 aumenta la expresión de c-fos (Takata *et al.*, 2008) y también activa al factor de transcripción NF- κ B (Rodríguez-Calvo *et al.*, 2008). La unión de c-fos a AP-1 y la activación de NF- κ B incrementan la expresión de una variedad de genes proinflamatorios y proaterogénicos, incluyendo TNF α , IL-1 β , IL-6 e ICAM-1. De hecho, el aumento

de la actividad de ERK1/2 en aorta de SHR, se acompañó de un incremento en la expresión de estos genes, el cual se vio reducido en aorta de SHR tratadas con GW0742. Por lo tanto, estos resultados demuestran que el agonista PPAR β efectivamente inhibe la inflamación vascular y la expresión de genes proaterogénicos en aorta de SHR, lo que confirma resultados previos *in vivo* en aterosclerosis acelerada por Ang II en ratones LDL^{-/-} alimentados con una dieta alta en grasa (Takata *et al.*, 2008). Los efectos antiinflamatorios de PPAR β podrían estar relacionados con la disminución de la presión arterial. Sin embargo, otros mecanismos deben estar involucrados, ya que los fármacos antihipertensivos, como hidralazina, no reducen las citocinas proinflamatorias (Cardinale *et al.*, 2010), y los agonistas PPAR β también presentan efectos antiinflamatorios *in vitro* (Lee *et al.*, 2003).

2.5. Participación de RGS.

Estudios de microarrays a nivel vascular en dos modelos de hipertensión, incluyendo SHR, identificaron a la caveolina-1, RGS2 y RGS5 como principales dianas antihipertensivas (Grayson *et al.*, 2007). Las proteínas RGS desempeñan un papel importante en la regulación de la señalización de los receptores acoplados a proteínas G mediante la unión a la subunidad G activa y la estimulación de la hidrólisis de GTP, finalizando la señalización de la proteína G (Bansal *et al.*, 2007). Por lo tanto, la disminución de RGS potencia el efecto de vasoconstrictores como ET y Ang II (Heximer *et al.*, 2003), conduciendo a la activación de ERK1/2 (Wang *et al.*, 2002). En nuestro estudio, la expresión génica de RGS4 y RGS5 estaba disminuida en SHR en comparación con WKY. Las regiones promotoras de RGS4 y RGS5 contienen PPRE, lo que sugiere que las RGS son dianas transcripcionales directas de PPAR. Del mismo modo, encontramos que la activación de PPAR β incrementó la expresión de RGS4 y RGS5 en aorta de SHR,

por lo que estaría involucrada en la reducción de la fosforilación de ERK1/2 en ratas SHR tratadas con GW0742. Además, los PPAR β pueden atenuar la vía de señalización de los receptores de quimiocinas mediante la inducción de las proteínas RGS. Todos estos resultados sugieren que el aumento de RGS puede ser esencial en los efectos de los agonistas PPAR β aquí descritos, incluyendo sus propiedades antioxidantes, antihipertensivas y antiinflamatorias.

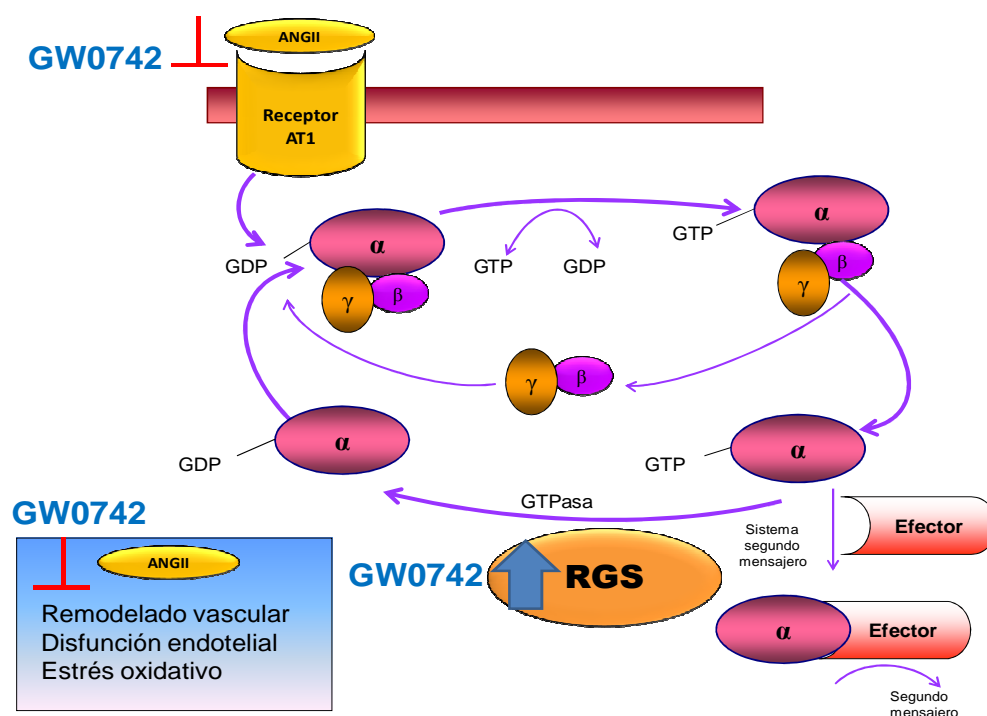


Figura 41. Esquema de los efectos de GW0742 sobre la expresión de las RGS en SHR, y por tanto su actuación sobre las acciones mediadas por la Ang II.

Para apoyar aun más esta hipótesis, se realizó otra serie de experimentos *in vitro*, que tuvo como objetivo analizar el papel de PPAR β y RGS $_5$ en la activación vascular mediada por vías dependientes e independientes de la proteína G. La incubación durante 6 horas con GW0742 reguló al alza RGS4 y RGS5, y estos efectos fueron suprimidos en presencia de un antagonista selectivo de PPAR β .

Por otra parte, el aumento en la regulación de RGS se asoció con una disminución significativa de la contracción de Ang II y de la actividad NADPH oxidasa estimulada por Ang II y con una inhibición parcial de las respuestas a ET-1 sin inducirse alteraciones en las respuestas a Phe, agonista α -adrenérgico, y KCl, vasoconstrictor independiente de receptor. Esta disminución de los efectos de Ang II y ET-1 no se asoció con cambios en la expresión del receptor tipo 1 de Ang II o del receptor ET_A.

En conclusión, nuestros resultados demuestran claramente que la activación de PPAR β reduce la presión arterial elevada, el remodelado vascular, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular en este modelo de hipertensión genética. Estos efectos parecen ser consecuencia del aumento de la biodisponibilidad del NO, debido a la reducción de la producción de O₂⁻ mediada por NADPH oxidasa. Los efectos protectores en la pared vascular están relacionados con la regulación al alza de las vías de eNOS y AKT y con una reducción de la actividad ERK1/2 a través de la disminución de la expresión de caveolina-1 y el incremento de la expresión de RGS4 y RGS5.

3. Efecto antihipertensor de la activación PPAR β en la hipertensión inducida por mineralcorticoides.

En esta Tesis Doctoral se proporciona la primera evidencia de que el tratamiento crónico con el agonista altamente selectivo PPAR β , GW0742, a la dosis de 20 mg/Kg, evita el aumento progresivo de la PAS, el estrés oxidativo sistémico y vascular y la disfunción endotelial en ratas uninefrectomizadas y con la administración crónica de DOCA y sal. Estos efectos parecen estar relacionados con una activación directa de PPAR β en la pared vascular, lo que interfiere con la señalización de ET-1 que conduce a la disfunción endotelial, como consecuencia del aumento de la expresión de RGS5. Por otra parte, una vasodilatación en

arterias de resistencia, independiente de PPAR β , podría colaborar a un efecto antihipertensivo.

Como ya hemos demostrado, la dosis de 5 mg/Kg de GW0742 ejerce efectos antihipertensivos, restaura la estructura y función vascular y reduce el estado oxidativo, proinflamatorio y proaterogénico en SHR. Estos efectos protectores parecían estar relacionados con una mayor expresión de RGS4 y RGS5, que modula negativamente las acciones vasculares de la Ang II. Nuestros datos en el modelo DOCA-sal muestran que esta dosis de GW0742 sólo origina efectos antihipertensivos, sin afectar la función endotelial y el estrés oxidativo, lo que concuerda con la menor eficacia de los fármacos que reducen la actividad del sistema renina-angiotensina en los modelos de hipertensión independientes de la renina, como la hipertensión DOCA-sal, por ejemplo, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Pu *et al.*, 2002) y antagonistas de los receptores AT-1 (Somers *et al.*, 2000).

En el presente estudio también se mostró una disociación clara entre la elevada presión arterial y la función endotelial, ya que GW0742 a 5 mg/Kg fue incapaz de mejorar la disfunción endotelial, pero evitó el aumento de la PAS (alrededor del 61%), indicando la participación de otros mecanismos antihipertensivos independientes de la función endotelial. Resultados similares se han descrito previamente para el agonista PPAR α , fenofibrato (Iglarz *et al.*, 2003b).

3.1. Papel del sistema de endotelina.

Ligandos PPAR α y PPAR γ previenen el aumento de la PAS en ratas DOCA-sal al inhibir la expresión génica de preproET-1 (Iglarz *et al.*, 2003b). Esto concuerda con la disminución de la presión arterial de los bloqueadores selectivos de los receptores de ET y con la idea de que la ET-1 participa en la fisiopatología

de este modelo de hipertensión (Li *et al.*, 1994). Sin embargo, el agonista PPAR β GW0742 fue incapaz de reducir el mRNA de la preproET-1 vascular y los niveles plasmáticos de ET-1, mostrando una diana diferente PPAR α y PPAR γ para mejorar la función cardiovascular en ratas DOCA-sal. Paradójicamente, la dosis de GW0742 20 mg/Kg aumentó la expresión génica de la preproET-1 en ratas DOCA-sal. El mecanismo de esta respuesta aún no se ha establecido, pero esta respuesta fue similar a la que se encontró con el antagonista no selectivo de ET, bosentan (Li *et al.*, 1994), lo que sugiere que el bloqueo de la señalización de ET-1 da lugar a un aumento del mRNA de la preproET-1 en el tejido vascular, y que la dosis más alta de GW0742 también puede interferir con la señalización intracelular de ET-1, como se describió previamente en esta Tesis Doctoral.

La expresión de PPAR β en la aorta se incrementó en ratas DOCA-sal y en SHR (Zarzuelo *et al.*, 2011), en comparación con las ratas control. El tratamiento crónico con GW0742 revirtió estos cambios. Sin embargo, a pesar del aumento de PPAR β en la aorta de las ratas DOCA-sal, la expresión génica de su gen diana, PDK4 se mantuvo sin cambios. Este cambio en la expresión de PPAR β podría estar relacionado con una escasa captación de ligandos endógenos PPAR β (como ácidos grasos), como ya se sugirió en las ratas SHR que son genéticamente deficientes en CD36, un transportador de membrana de ácidos grasos (Aitman *et al.*, 1999), que fue corregido por la administración del ligando exógeno de PPAR β , GW0742. Sin embargo, no hay información acerca de la expresión de CD36 en la aorta de ratas DOCA-sal. Es interesante que GW0742 indujo, de una manera concentración-dependiente, un incremento en la expresión del gen PDK4 en la aorta, lo que confirma que el tratamiento crónico con GW0742 activó PPAR β en el sistema vascular.

3.2. Efectos sobre la morfología cardíaca.

La rata DOCA-sal es un modelo de hipertensión grave y se caracteriza por un aumento del contenido de ET-1 en el tejido y de fibrosis e hipertrofia cardíaca (Larivière *et al.*, 1995; Ammarguellat *et al.*, 2001). Se ha descrito que la ET-1 induce el crecimiento de los cardiomiocitos *in vitro* y promueve la síntesis de colágeno por los fibroblastos cardíacos (Yamazaki *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1993). Agonistas PPAR α y PPAR γ modulan el remodelado cardíaco en la hipertensión inducida por mineralocorticoides, en parte asociado a una disminución de la producción de ET-1 (Iglarz *et al.*, 2003b) y/o a la supresión de la hipertrofia de los cardiomiocitos inducida por ET-1 como consecuencia del aumento de diacilglicerol kinasa y la posterior inhibición de la PKC (Huang *et al.*, 2011). En el presente estudio, GW0742, a pesar de su efecto antihipertensivo, redujo la hipertrofia cardíaca sólo con la dosis más alta, pero fue incapaz de reducir los niveles plasmáticos de ET-1, lo que sugiere que el efecto protector podría estar relacionado con la interferencia con señales de ET-1 en el miocardio que conducen a la hipertrofia cardíaca.

3.3. Efectos sobre la disfunción endotelial y las ROS.

La disminución de la vasodilatación aórtica dependiente de endotelio es una característica de la hipertensión DOCA-sal. Esta disfunción endotelial no estaba relacionada con cambios en la vía guanilato ciclasa-cGMP o con cambios en la expresión de eNOS, ya que las respuestas al donador de NO, NPS, y del contenido proteico de eNOS no se modificaron (Lima *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados anteriores en este modelo, la disfunción endotelial se asoció con un aumento del O₂⁻ vascular. La ET-1 está implicada en el desarrollo del estrés oxidativo y la disfunción endotelial en ratas DOCA-sal, ya que el bloqueo de los receptores ET_A reduce los niveles de O₂⁻ arterial y mejora la relajación

dependiente del endotelio (Li *et al.*, 2003). En nuestro estudio encontramos que en las ratas DOCA-sal aumentaron los niveles plasmáticos de MDA, un indicador de la producción de ROS sistémica, y ET-1, también aumentó la excreción urinaria de isoprostanos y el contenido de O_2^- en la aorta en relación con las ratas control, lo que se asocia con una disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio inducida por ACh.

Se conoce que la ET-1 activa la NADPH oxidasa vascular para producir O_2^- en ratas DOCA-sal a través de la regulación al alza de las subunidades de la NADPH oxidasa (Jiménez *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2003; Beswick *et al.*, 2001). Además la ET-1 incrementa la xantina oxidasa y ROS mitocondrial en este modelo de hipertensión.

En esta Tesis hemos encontrado que la actividad de la NADPH oxidasa y la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa, NOX-4, p22^{phox} y p47^{phox}, se incrementaron en la aorta de las ratas DOCA-sal y que este aumento está asociado con mayores niveles en la producción vascular de O_2^- . Además, 20 mg/Kg de GW0742 redujeron el aumento del contenido intracelular de O_2^- , la actividad NADPH oxidasa, la expresión de NOX4 y la alteración de la relajación inducida por la ACh, sin provocar efectos en los niveles plasmáticos de ET-1 ni en la expresión génica de preproET-1 en la aorta. En conjunto, todos estos datos indican que la mejoría de la disfunción endotelial inducida por GW0742 parece estar relacionada con un aumento de la biodisponibilidad del NO al reducir la producción de O_2^- por NADPH oxidasa, estimulada por la ET-1 en anillos de aorta. Otros mecanismos podrían contribuir a esta mejora tales como un posible aumento de la síntesis de NO, como resultado de una disminución del regulador alostérico negativo de la eNOS, caveolina-1, y una mayor sensibilidad a la vía NO-GMPc, como lo demuestra el pequeño aumento en la relajación a NPS inducida por GW0742 en ratas DOCA-sal. Además, cuando los anillos aórticos se incubaron *in vitro* con ET-1 para inducir la disfunción endotelial, GW0742

restauró la alteración de la relajación a la ACh, lo que demuestra una interferencia con la señalización de la ET-1 que conduce a la disfunción endotelial. Este efecto protector fue suprimido por el antagonista PPAR β , GSK0660, apoyando la participación de PPAR β en los efectos de GW0742.

3.4. Papel de las RGS.

Como ya hemos comentado las RGSs juegan un papel importante en la regulación de la señalización del receptor acoplado a proteínas G mediante la unión a la subunidad G activa y estimula la hidrólisis de GTP, por lo tanto inhibe la señalización de la proteína G (Bansal *et al.*, 2007). Por lo tanto, la regulación a la baja de las RGSs potencia el efecto de vasoconstrictores como la endotelina y angiotensina II (Heximer *et al.*, 2003). En nuestro experimento, la expresión del génica de RGS5 disminuyó en ratas DOCA-sal, en comparación con las ratas control. Las regiones promotoras de RGS5 contiene posibles PPRE, lo que sugiere que las RGSs son dianas directas de PPARs. Asimismo se encontró que GW0742 a la dosis de 20 mg/Kg restauró la expresión de RGS5 en la aorta de ratas DOCA-sal a niveles similares a los encontrados en las ratas control, sin provocar cambios en la expresión del receptor ET_A, por lo que podría originar en la reducción de la señalización de ET-1 por GW0742 en las ratas DOCA-sal. Todos estos datos sugieren que el aumento en la expresión de RGS5 puede ser un paso esencial en los efectos de los agonistas PPAR β descritos en esta Tesis Doctoral, incluyendo sus efectos antioxidantes, antihipertensivos y el efecto protector sobre la función endotelial. Sin embargo, la dosis de 5 mg/Kg GW0742 fue incapaz de aumentar la expresión de RGS5 en ratas DOCA-sal, lo que indica la participación de otros mecanismos independientes de la síntesis y/o la señalización de ET-1.

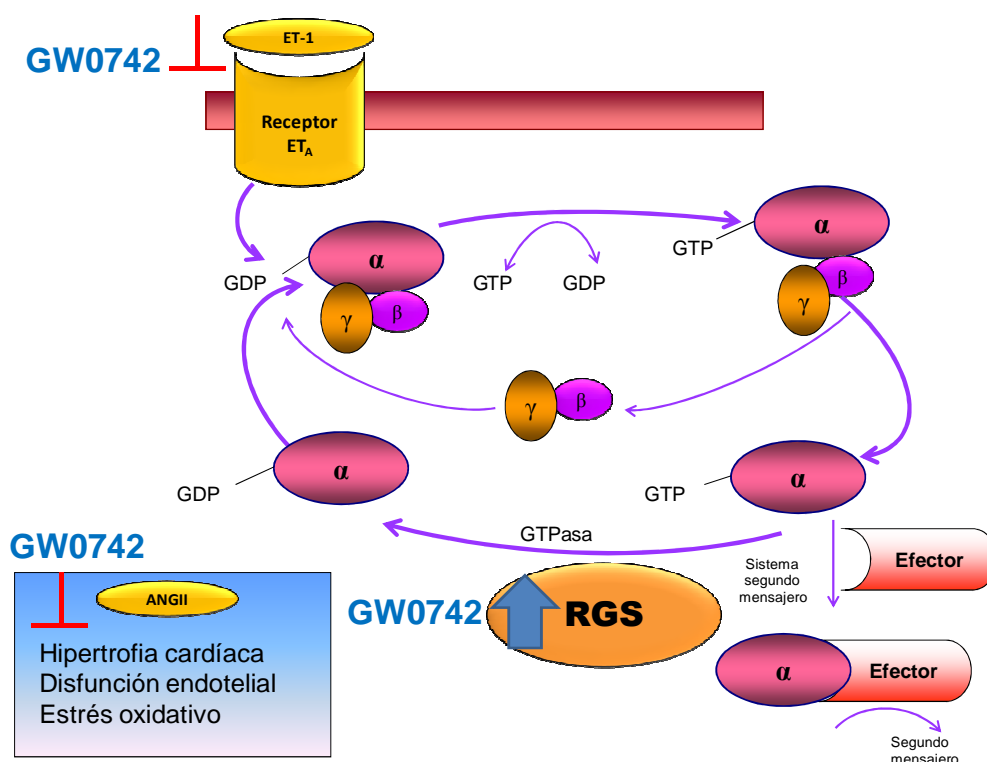


Figura 42. Efectos de GW0742 a la dosis de 20 mg/Kg sobre la expresión de RGS en las ratas DOCA-sal, y por tanto sus actuación sobre las acciones mediadas por la ET-1.

También se encontró que GW0742 indujo una respuesta relajante dependiente de la concentración en las pequeñas arterias mesentéricas, que fue significativa a concentraciones $< 1\mu\text{M}$ y podría colaborar a reducir la PAS. Esta respuesta vasodilatadora parece ser independiente de la liberación de NO endotelial, ya que no se modificó por la inhibición de la eNOS con L-NAME, y de la activación PPAR β , ya que no se vio afectada por el antagonista PPAR β , GSK0660. Se han descrito previamente resultados similares en arterias mesentéricas y pulmonares, y se atribuyen a la inhibición de la actividad de RhoA (Harrington *et al.*, 2010).

En conclusión, nuestros resultados demostraron claramente que la estimulación de PPAR β por GW0742 a dosis de 5 y 20 mg/Kg previene el

aumento de la presión arterial, y con la dosis más alta se mejora la hipertrofia cardíaca, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular en el modelo de hipertensión inducida por mineralocorticoides. La mejora de la función endotelial podría deberse al aumento de la biodisponibilidad del NO, derivada de la reducción de la producción de O_2^- estimulada por la ET-1. El aumento en la expresión de RGS5, que inhibe la señalización de ET-1, podría ser responsable de los efectos protectores en la pared vascular.

4. Perspectivas.

Los principales hallazgos interesantes y novedosos de este estudio son que los agonistas PPAR β inducen un efecto vasodilatador agudo mediado por la vía de PI3K/AKT/eNOS en células endoteliales. La activación de la vía PI3K/AKT por la activación PPAR β se observó anteriormente en otros tipos de células tales como los queratinocitos (Di-Poi *et al.*, 2002) y células progenitoras endoteliales (Han *et al.*, 2008). PPAR β es un regulador clave para tratar distintos aspectos del síndrome metabólico. El síndrome metabólico se caracteriza por bajas concentraciones plasmáticas de HDL, altos niveles de colesterol y de triglicéridos, hipertensión e hiperglucemia, así como resistencia a la insulina. Está asociado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Se sabe que la activación PPAR β eleva las HDL, disminuye los niveles de colesterol, de LDL y de TG y suprime la producción hepática de glucosa. De hecho como los ligandos PPAR β son muy eficaces en la regulación del metabolismo lipídico, están actualmente en fase de ensayos clínicos para el tratamiento de la dislipidemia, dirigidos especialmente a personas con bajos niveles de HDL y síndrome metabólico.

Los presentes resultados, han descrito efectos vasodilatadores de los agonistas PPAR β , por lo que podrían estar involucrados en efectos antihipertensivos y

también colaborar para mejorar el transporte de glucosa e insulina a los tejidos diana, una limitación importante en la hipertensión, lo que llevaría a la reducción de resistencia a la insulina.

Además se describe por primera vez la disminución de la presión arterial debida a un agonista PPAR β , identificando una nueva diana para tratar la hipertensión. Por otra parte, la mejora de la función endotelial, el estado proinflamatorio y proaterogénico de la pared vascular confiere propiedades interesantes a estos agonistas, ya que la disfunción endotelial es un marcador independiente de mal pronóstico en las enfermedades cardiovasculares. Estos resultados ponen de manifiesto una relación antagonista entre la señalización mediada por proteína G (Ang II, ET-1 y quimiocinas) y la activación PPAR β en la homeostasis vascular y demuestra la relevancia fisiológica de estas relaciones *in vivo*.

Conclusiones.

Conclusiones

1. Los agonistas PPAR β , L165041 y GW0742, producen un efecto rápido en el tejido vascular de rata que conduce a una vasodilatación concentración dependiente. Este efecto parece estar relacionado, en parte, con activación de receptores PPAR β a través de mecanismos no genómicos. La relajación es principalmente dependiente de endotelio y NO y no está relacionada con la clásica vía calcio/calmodulina para la activación de eNOS, sino con su fosforilación por la vía PI3K/AKT. El componente residual independiente de endotelio tampoco se ve afectado por la eliminación de calcio extracelular, y parece no estar relacionado con la activación de PPAR β .

2. La activación de PPAR β por GW0742 a la dosis de 5 mg/Kg reduce la presión arterial elevada, el remodelado vascular, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular en el modelo de hipertensión genética SHR. Estos efectos parecen ser consecuencia del aumento de la biodisponibilidad del NO, debido a la reducción de la producción de O $_2^-$ mediada por NADPH oxidasa. Los efectos protectores en la pared vascular están relacionados con la regulación al alza de las vías de eNOS y AKT y con una reducción de la actividad ERK1/2 a través de la disminución de la expresión de caveolina-1 y el incremento de la expresión de RGS4 y RGS5.

3. La estimulación de PPAR β por GW0742 a dosis de 5 y 20 mg/Kg previene el aumento de la presión arterial, y con la dosis más alta se mejora la hipertrofia cardíaca, la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular en el modelo de hipertensión inducida por mineralocorticoides. La mejora de la función endotelial podría deberse al aumento de la biodisponibilidad del NO, derivada de la reducción de la producción de O $_2^-$ estimulada por la ET-1. El aumento en la

expresión de RGS5, que inhibe la señalización de ET-1, podría ser responsable de los efectos protectores en la pared vascular.

4. La vía de señalización intracelular responsable de las acciones vasculares de la Ang II es más sensible a inhibición por GW0742 que la de ET-1.

Conclusions.

Conclusions

1. PPAR β agonists L165041 and GW0742 produce fast, concentration-dependent relaxant effects in rat vascular tissue. These effects seem to be operated partially via PPAR β receptors through nongenomic mechanisms. Relaxation is mostly endothelium- and NO-dependent and it is not related with the classic Ca²⁺/calmoduline pathway for eNOS activation but with its phosphorylation via the PI3K/Akt pathway. The residual endothelium-independent component was also unaffected by removal of extracellular Ca²⁺, and seems to be unrelated to PPAR β activation.

2. PPAR β stimulation reduces the elevated blood pressure, the vascular remodeling, the endothelial dysfunction, and the vascular oxidative stress in this model of genetic hypertension. These effects seem to be related to the increased NO bioactivity, resulting from reduced NADPH oxidase-mediated O₂⁻ production. These protective effects in the vascular wall are related to the upregulation of eNOS and AKT pathways and downregulation of ERK1/2 activity through decreased expression of caveolin 1 and upregulation of RGS4 and RGS5.

3. PPAR β stimulation reduces the raise in blood pressure, and at the higher dose of 20 mg/Kg improves the cardiac hypertrophy, the endothelial dysfunction and the vascular oxidative stress in this model of mineralocorticoid-induced hypertension. These effects in endothelial function seem to be related to the increased NO bioactivity, resulting from reduced NADPH-oxidase mediated O₂⁻ production stimulated by ET-1. Upregulation of RGS5, which would inhibit ET-1 signaling could be related to these protective effects.

4. The intracellular signaling pathway responsible for the vascular actions of Ang II is more sensitive to inhibition by GW0742 than ET-1.

Bibliografía.

Aalkjaer C, Heagerty AM, Petersen KK, Swales JD, Mulvany MJ. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation-contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ Res* 1987; 61:181-186.

Abrams JM, Osborn JW. Osmoregulatory function in health disease: a role for benzamil-sensitive proteins of the central nervous system in the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:687-694.

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.

Ali FY, Davidson SJ, Moraes LA, Traves SL, Paul-Clark M, Bishop-Bailey D, Warner TD, Mitchell JA. Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPARbeta. *FASEB J*. 2006;20:326-8.

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.

Alvarez de Sotomayor M, Mingorance C, Andriantsitohaina R. Fenofibrate improves age-related endothelial dysfunction in rat resistance arteries. *Atherosclerosis.* 2007;193:112-120.

Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation.* 2001;103:319-24.

Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110:2233-40.

de Andrade RL, Meirelles LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effect of enalapril in spontaneously hypertensive rats cardiac remodeling with nitric oxide synthesis blockade. *J Cell Mol Med.* 2002;6:599-608.

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.

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1990;15:699-703.

Awe SO, Tsakadze NL, D'Souza SE, Adeagbo AS. Tert-butyl hydroperoxide-mediated vascular responses in DOCA-salt hypertensive rats. *Vascul Pharmacol*. 2003;40:51-7.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93:1464-76.

Bae EH, Kim IJ, Ma SK, Kim SW. Rosiglitazone prevents the progression of renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2010;33:255-62.

Bansal G, Druey KM, Xie Z. R4 RGS proteins: regulation of G-protein signaling and beyond. *Pharmacol Ther*. 2007;116:473-495.

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

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.

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.

Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension.* 1989;13:968-972.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245-313.

Bengtson SHM, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:849-54.

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.

Bennett-Richards K, Kattenhorn M, Donald A, Oakley G, Varghese Z, Rees L, Deanfield JE. Does oral folic acid lower total homocysteine levels and improve endothelial function in children with chronic renal failure? *Circulation.* 2002;105:1810-5.

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.

Berry CE and Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004;555:589-606.

Beswick, R.A.; Dorrance, A.M.; Leite, R.; Webb, R.C. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* 2001;38:1107-1111.

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.

Bishop-Bailey D, Swales KE. The Role of PPARs in the Endothelium: Implications for Cancer Therapy. *PPAR Res.* 2008;2008:904251.

Blanco-Rivero J, Cachafeiro V, Lahera V, Aras-Lopez R, Márquez-Rodas I, Salices M, Xavier FE, Ferrer M, Balfagón G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 2005;46:107-112.

Bockman CS, Jeffries WB, Pettinger WA, Abel PW. Enhanced release of endothelium derived relaxing factor in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 1992;20:304-313.

Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis.* 2007;190:408-415.

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.

Bouvier M, de Champlain J. Increased basal and reactive plasma norepinephrine and epinephrine levels in awake DOCA-salt hypertensive rats. *J Auton Nerv Syst.* 1986;15:191-195.

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;137:354-66.

Brooks VL, Freeman KL, Qi Y. Time course of synergistic interaction between DOCA and salt on blood pressure: roles of vasopressin and hepatic osmoreceptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291:R1825-R1834.

Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, Kranzhofer R. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* 2000;95:98-105.

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

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

Bugiardini R, Manfrini O, Pizzi C, Fontana F, Morgagni G. Endothelial Function Predicts Future development of Coronary Artery Disease: A Study of Women With Chest Pain and Normal Coronary Angiograms. *Circulation*. 2004;109:2518-23.

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.

Bund SJ, West KP, Heagerty AM. Effects of protection from pressure on resistance artery morphology and reactivity in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Circ Res*. 1991;68:1230-1240.

Burdick AD, Bility MT, Giroir EE, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM. Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPARbeta/delta) inhibits cell growth of human N/TERT-1 keratinocytes. *Cell Signal*. 2007;19:1163-1171.

Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma. *Cell Cycle*. 2007;6:1539-48.

Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*. 2000;35:746-51.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2003;24:471-8.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-4.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano AC, Touyz RM. Endothelin-1-induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)* 2006;110:243-253.

Callera GE, Touyz RM, Teixeira SA, Muscara MN, Helena M, Carvalho C, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin EL, Tostes RC. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension.* 2003;42:811-7.

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

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension.* 1997;30:57-63.

Cediel E, Sanz-Rosa D, Oubina MP, de las Heras N, González Pacheco FR, Vegazo O, Jiménez J, Cachofeiro V, Lahera V. Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R674-81.

Chabrashvili T, Kitiyakara C, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Effects of ANG II type 1 and 2 receptors on oxidative stress, renal NADPH oxidase, and SOD expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285: R117-24.

Chamseddine AH and Miller JFJ. gp91phox contributes to NADPH oxidase activity in aortic fibroblasts, but not smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2284-H2289.

Chatziantoniou C, Daniels FH, Arendshorts WJ. Exaggerated renal vascular reactivity to angiotensin and thromboxane in young genetically hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1990;259:F372-F382.

Chen F, Wang M, O'Connor JP, He M, Tripathi T, Harrison LE. Phosphorylation of PPARgamma via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF-kappabeta. *J Cell Biochem.* 2003;90:732-44.

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

Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001;38:606-611.

Chen Y, Sin Y, Lin J, Zhou A, Wang H. Research on the mechanism of endothelin inflammatory effects on human mesangial cells. *Chin Med J.* 1997;110:530-4.

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.

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.

Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S and Freedman LP (2007) Signaling by estrogens. *J Cell Physiol.* 213:610-617.

Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998;273:25573-80.

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.

Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 1998;31:643-648.

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.

Committee NRN. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999;97:161-3.

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.

Cordellini S, Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990;8:53-60.

Cordellini S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *Gen Pharmacol*. 1999;32:315-20.

Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Lüscher TF. 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*. 2003;107:1017-1023.

Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1994;23:229-235.

Crofton JT, Share L, Shade RE, Lee-Kwon WJ, Manning M & Sawyer WH. The importance of vasopressin in the development and maintenance of DOC-salt hypertension in the rat. *Hypertension*. 1979;1:31-38.

Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1657:1-22.

Danaoglu Z, Kultursay H, Kayikcioglu M, Can L, Payzin S. Effect of statin therapy added to ACE-inhibitors on blood pressure control and endothelial functions in normolipidemic hypertensive patients. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2003;3:331-7.

Davignon J and Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109:III27-32.

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

Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, Mimran A, Jover B. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40:142-7.

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.

Deng LY, Schiffrin EL. Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1992;5:817-822.

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 (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med.* 2001;193:827-38.

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.

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.

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.

Di-Poi N, Tan NS, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell.* 2002;10:721-733.

Doyle AE, Black H. Recativity to pressor agents in hypertension. *Circulation.* 1955;12:974-980.

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.

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

Dworkin LD, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest.* 1984;73:1448-1461.

Dzielak DJ, Norman RA. Renal nerves are not necessary for onset or maintenance of DOC-salt hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1985;24: H945-H949.

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

Elijovich, F.; Laffer, C.L.; Amador, E; Gavras, H.; Bresnahan, M.R.; Schiffrin, E.L. Regulation of plasma endothelin by salt in salt-sensitive hypertension. *Circulation.* 2001;103:263-268.

Elmarakby AA, Loomis ED, Pollock JS, Pollock DM. NADPH oxidase inhibition attenuates oxidative stress but not hypertension produced by chronic ET-1. *Hypertension.* 2005;45:283-7.

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

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.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol*. 1990;186:407-421.

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.

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.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H985-H1002.

Fenoy FJ, Milicic I, Smith RD, Wong PC, Timmermans PB, Roman R. Effects of dup 753 on renal function of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1991;4:321-326.

Folkow B, Johansson B, Oberg B. The stimulation threshold of different sympathetic fibre groups as correlated to their functional differentiation. *Acta Physiol Scand*. 1958;44:146-156.

Folkow B. The fourth Volhard lecture: cardiovascular structural adaptation; its role in the initiation and maintenance of primary hypertension. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1978;4:3-22.

Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem.* 2006;387:1521-33.

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.

Fortuno A, Tisaire J, Lopez R, Bueno J, Diez J. Angiotensin converting enzyme inhibition corrects Na⁺/H⁺ exchanger overactivity in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1997;10:84-93.

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999;26:112-122, 124-125.

Frochlich E, Apstein C, Chobanian A, Devereux R, Dustan H, Dzau V, Fauad-Tarazi F, Horan M, Marcus M, Massie B, Pfefer M, Re R, Roccella E, Savage D, Shub C. The heart in hypertension. *N Engl J Med.* 1993;327:998-1008.

Fukumoto K, Yano Y, Virgona N, Hagiwara H, Sato H, Senba H, Suzuki K, Asano R, Yamada K, Yano T. Peroxisome proliferatoractivated receptor delta as a molecular target to regulate lung cancer cell growth. *FEBS Lett.* 2005;579:3829-3836.

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.

Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-62.

Galisteo M, García-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Wangensteen R, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med.* 2004a;70:334-41.

Galisteo M, García-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2004b;259:91-9.

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.

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.

Glinghammar B, Skogsberg J, Hamsten A and Ehrenborg E. PPARdelta activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:361-368.

Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Félétou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2006;146:834-84.

Gluais P, Paysant J, Badier-Commander C, Verbeuren T, Vanhoutte PM, Félétou M. In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A2 as endothelium-derived contracting factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H2255-H2564.

Gluais P, Vanhoutte PM, Félétou M. Mechanisms underlying ATP-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta. *Eur J Pharmacol.* 2007;556:107-114.

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002;105:1567-72.

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, Vita JA. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1769-75.

Gomez E, Schwendemann C, Roger S, Simonet S, Paysant J, Courchay C, Verbeuren TJ, Félétou M. Aging and prostacyclin responses in aorta and platelets from WKY and SHR rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H2198-H2211.

Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jiménez L, Jos A, Cameán AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem.* 2007;18:533-40.

Gong KW, Zhu GY, Wang LH, Tang CS. Effect of active oxygen species on intimal proliferation in rat aorta after arterial injury. *J Vasc Res.* 1996;33:42-46.

Gonzalez-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yague S, Jiménez S, Bragado R, Alvarez-Arroyo MV. Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:392-8.

Graham DA, Rush JW. Cyclooxygenase and thromboxane/ prostaglandin receptor contribute to aortic endothelium-dependent dysfunction in aging female spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol.* 2009;107:1059-1067.

Graham RM, Pettinger WA, Sagalowsky A, Brabson J, Gandler T. Renal alphaadrenergic receptor abnormality in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1982;4:881-7.

Graham TL, Mookherjee C, Suckling KE, Palmer CN, Patel L. The PPARdelta agonist GW0742X reduces atherosclerosis in LDLR^{-/-} mice. *Atherosclerosis.* 2005;181:29-37.

Gavras; H.; Brunner; H.R.; Laragh, J.H.; Vaughan, E.D.Jr.; Koss, M.; Cote, L.J.; Gavras, I. Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess: role of renin and sodium in vascular changes. *Circ. Res.*1975;36:300-309.

Grayson TH, Ohms SJ, Brackenbury TD, Meaney KR, Peng K, Pittelkow YE, Wilson SR, Sandow SL, Hill CE. Vascular microarray profiling in two models of hypertension identifies caveolin-1, Rgs2 and Rgs5 as antihypertensive targets. *BMC Genomics.* 2007;8:404.

Green DM, Coleman DH, McCabe M. Mechanisms of desoxycorticosterone action; relation of sodium chloride intake to fluid exchange pressor effects and survival. *Am J Physiol.* 1948;154:465-474.

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.

Griendling; K.K.; Alexander, R.W. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation.* 1997;96:3264-3265.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86:494-501.

Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 2004;90:491-3.

Grimaldi PA, Teboul L, Gaillard D, Armengod AV, Amri EZ. Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Mol Cell Biochem.* 1999;192:63-8.

Grover AK, Samson SE, Robinson S, Kwan CY. Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C294-301.

Grunfeld M, Deis A, Sorensen TI, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. *BMJ.* 1995;310:1165-169.

Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension.* 1995;26:854-857.

Guerre-Millo M, Gervois P, Raspé E, Madsen L, Poulain P, Derudas B, Herbert JM, Winegar DA, Willson TM, Fruchart JC, Berge RK, Staels B. Peroxisome proliferator activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem.* 2000;275:16638-42.

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.

Guo W, Adachi T, Matsui R, Xu S, Jiang B, Zou MH, Kirber M, Lieberthal W, Cohen RA. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1396-403.

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.

Gupta RA, Wang D, Katkuri S, Wang H, Dey SK, DuBois RN. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth. *Nat Med*. 2004;10:245-247.

Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106:653-8.

Hall CE, Hall O. Methylandrostenediol hypertension induced without salt excess: observations on organ changes and serum composition. *Am J Pathol*. 1969;54:489-505.

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

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension*. 2001;37:529-34.

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 LS, Moreno L, Reed A, Wort SJ, Desvergne B, Garland C, Zhao L, Mitchell JA. 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;69:781-790.

Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K. Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1999;145:727-740.

He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell.* 1999;99:335-45.

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.

Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993;21:391-397.

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

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.

Heximer SP, Knutsen RH, Sun X, Kaltenbronn KM, Rhee MH, Peng N, Oliveirados Santos A, Penninger JM, Muslin AJ, Steinberg TH, Wyss JM, Mecham RP, Blumer KJ. Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *J Clin Invest.* 2003;111:445-452.

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.

Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol*. 1981;241:85-93.

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

Huang Y, Zhang H, Shao Z, O'Hara KA, Kopilas MA, Yu L, Netticadan T, Anderson HD. Suppression of endothelin-1-induced cardiac myocyte hypertrophy by PPAR agonists: role of diacylglycerol kinase zeta. *Cardiovasc Res*. 2011;90:267-75.

Hyndman ME, Verma S, Rosenfeld RJ, Anderson TJ, Parsons HG. Interaction of 5 methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H2167-72.

Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on

vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:45-51.

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.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 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.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000;87:179-83.

Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Sakai S, Kasuya Y, Ogata T, Takanashi M, Iemitsu M, Sudo T, Goto K, Yamaguchi I. Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha partly via blockade of c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Circulation.* 2004;109:904-10.

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

Ito S, Carretero OA. Impaired response to acetylcholine despite intact endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide in isolated microperfused afferent arterioles of the spontaneously hypertensive rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;12:S187-9.

Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1993;92:398-403.

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.

Izzard AS, Cragoe EJ Jr, Heagerty AM. Intracellular pH in human resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension* 1991;17:780-786.

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.

Jacob F, Clark LA, Guzman PA & Osborn JW. Role of renal nerves in development of hypertension in DOCA-salt model in rats: a telemetric approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1519-H1529.

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.

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.

Jiménez R, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Romero M, Quintela AM, López-Sepúlveda R, Galindo P, Gómez-Guzmán M, Haro JM, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Endothelium-dependent vasodilator effects of peroxisome proliferator-activated receptor beta agonists via the phosphatidyl-inositol-3 kinase-Akt pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;332:554-561.

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.

Kaddatz K, Adhikary T, Finkernagel F, Meissner W, Müller-Brüsselbach S, Müller R. Transcriptional profiling identifies functional interactions of TGF β and PPAR β/δ signaling: synergistic induction of ANGPTL4 transcription. *J Biol Chem.* 2010;285:29469-79.

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.

Katholi RE, Naftilan AJ, Oparil S. Importance of renal sympathetic tone in the development of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension.* 1980;2:266-273.

<http://ep.physoc.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=hypertensionaha&resid=2/3/266>

Katusiæ ZS, Shepherd JT. Endothelium-derived vasoactive factors: II. Endothelium dependent contraction. *Hypertension.* 1991;18:86-92.

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.

Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S and Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol.* 2004;5:104-112.

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.

Kim DJ, Akiyama TE, Harman FS, Burns AM, Shan W, Ward JM, Kennett MJ, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279:23719-23727.

Kim DJ, Bility MT, Billin AN, Willson TM, Gonzalez FJ, Peters JM. PPARbeta/delta selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation. *Cell Death Differ.* 2006;13:53-60.

Kim DJ, Murray IA, Burns AM, Gonzalez FJ, Perdew GH and Peters JM: Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity. *J Biol Chem.* 2005;280:9519-9527.

Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, Reitman ML, Yakar S, Stannard B, Heron-Milhavet L, Wheeler MB, LeRoith D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of

type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes*. 2003;52:1770-8.

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 S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Wada T, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Role of angiotensin II in renal injury of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 1994;24:195-204.

Kinlay S, Behrendt D, Fang JC, Delagrangé D, Morrow J, Witztum JL, Rifai N, Selwyn AP, Creager MA, Ganz P. Long-term effect of combined vitamins E and C on coronary and peripheral endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:629-34.

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.

Kitts DD, Yuan YV, Godin DV. Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76:202-209.

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.

Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K and Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7355-7359.

Knuepfer MM, Akeyson EW, Schramm LP. Spinal projections of renal afferent nerves in the rat. *Brain Res*. 1988;446:17-25.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67phox participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 1999;274:25051-60.

Konieczkowski M, Dunn MJ, Stork JE, Hassid A. Glomerular synthesis of prostaglandins and thromboxane in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1983;5:446-452.

Kopp UC, Cicha MZ, Smith LA. Arterial pressure increases in afferent renal denervated rats on high-sodium diet. *Hypertension*. 2003; 42:968-973.

Korsgaard N, Christensen KL, Mulvany MJ. Cellular morphology in mesenteric resistance vessels from antihypertensive treated spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol*. 1991;1:33-41.

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

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 delta. *Diabetes*. 2005;54:1157-63.

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

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.

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, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 1998;58:3344-52.

Kuhlmann D, Ragan C, Ferrebee JW, Atchley DW, Loeb RF. Toxic effects of desoxycorticosterone esters in dogs. *Science*. 1939; 90:496-497.

Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun.* 1993; 19:59-66.

Lahera V, Navarro J, Biondi ML, Ruilope LM, Romero JC. Exogenous cGMP prevents decrease in diuresis and natriuresis induced by inhibition of NO synthesis. *Am J Physiol.* 1993;264:F344-F347.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003;111:1201-9.

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 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.

Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac. *GTP Mol Cell.* 2000;6:899-907.

Larivière R, Deng LY, Day R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2123-31.

Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1993;21:294-300.

Lassègue B and Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285:R277-97.

Lassègue B and Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension: an update. *Am J Hypertens*. 2004;17:852-60.

Lassègue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signalling pathways. *Circ Res*. 2001;88:888-94.

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 KS, Park JH, Lee S, Lim HJ, Park HY. PPARdelta activation inhibits angiotensin II induced cardiomyocyte hypertrophy by suppressing intracellular Ca²⁺ signaling pathway. *J Cell Biochem*. 2009;106:823-834.

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.

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.

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 α alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett.* 2000;473:333-6.

Leikert JF, Räthel TR, Müller C, Vollmar AM and Dirsch VM. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett.* 2001;506:131-134.

Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:335-63.

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.

Letizia, C.; Cerci, S.; De Toma, G.; D'Ambrosio, C.; De Ciocchis, A.; Coassin, S.; Scavo, D. High plasma endothelin-1 levels in hypertensive patients with low-renin essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 1997;11:447-451.

Li P, Akimoto T, Zhang M, Williams RS, Yan Z. Resident stem cells are not required for exercise-induced fiber-type switching and angiogenesis but are necessary for activity-dependent muscle growth. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C1461-8.

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 PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest.* 2004;114:1564-76.

Li JS, Larivière R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1994;24:183-8.

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 gamma-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.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem.* 2002;277:1645-8.

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.

Lodi F, Cogolludo A, Duarte J, Moreno L, Coviello A, Peral De Bruno M, Vera R, Galisteo M, Jiménez R, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Increased NADPH oxidase activity mediates spontaneous aortic tone in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;544:97-103.

Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS. Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315:1058-64.

López-Sepúlveda R, Gómez-Guzmán M, Zarzuelo MJ, Romero M, Sánchez M, Quintela AM, Galindo P, O'Valle F, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jiménez R. Red wine polyphenols prevent endothelial dysfunction induced by endothelin-1 in rat aorta: role of NADPH oxidase. *Clin Sci (Lond).* 2011;120:321-33.

Louis WJ, Tabei R, Sjoerdsma A, Spector S. Inheritance of high blood-pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Lancet.* 1969;1:561-567.

Lundin SA, Hallback-Nordlander M. Background of hyperkinetic circulatory state in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1980;14:561-567.

Luquet S, Lopez-Soriano J, Holst D, Fredenrich A, Melki J, Rassoulzadegan M, Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptor α controls muscle development and oxidative capability. *FASEB J.* 2003;17:2299-301.

Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1990;3:55-58.

Lüscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1987;9:157-63.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986;8:344-348.

Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:1135-1142.

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.

Martin-Nizard F, Furman C, Delerive P, Kandoussi A, Fruchart JC, Staels B, Duriez P. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40:822-31.

Maschio G, Oldrizzi L, Tessitore N, D'Angelo A, Valvo E, Lupo A, Loschiavo C, Fabris A, Gammara L, Rugiu C, Panzetta G. Effects of dietary protein and phosphorus restriction on the progression of early renal failure. *Kidney Int*. 1982;22:371-376.

Matsuguchi H, Schmid PG. Acute interaction of vasopressin and neurogenic mechanisms in DOC-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1982;242:H27-H43.

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.

Meissner M, Berlinski B, Doll M, Hrgovic I, Laubach V, Reichenbach G, Kippenberger S, Gille J, Kaufmann R. AP1-dependent repression of TGF α -mediated MMP9 upregulation by PPAR δ agonists in keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2011;20:425-9.

Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, Muller DN, Fiebeler A, Ganten U, Ganten D, Luft FC. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension.* 2001;37:414-8.

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.

Minutoli L, Antonuccio P, Polito F, Bitto A, Squadrito F, Irrera N, Nicotina PA, Fazzari C, Montalto AS, Di Stefano V, Romeo C, Altavilla D. Peroxisome proliferator activated receptor beta/delta activation prevents extracellular regulated kinase 1/2 phosphorylation and protects the testis from ischemia and reperfusion injury. *J Urol.* 2009;181:1913-21

Miyamoto Y, Akaike T, Yoshida M, Goto S, Horie H, Maeda H. Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xantine oxidase inhibitors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996;211:366-376.

Möhring J, Möhring B, Petri M, Haack D. Vasopressor role of ADH in the pathogenesis of malignant DOC hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1977;232:F260-F269.

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

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 AC, Amiri F, Tostes RC, Touyz RM, Schiffrin EL. 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;1:150-60.

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.

Moreau P, Schiffrin EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:511-21.

Morrow JD, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1-9.

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.

Müller-Brüsselbach S, Ebrahimsade S, Jäkel J, Eckhardt J, Rapp UR, Peters JM, Moll R, Müller R. Growth of transgenic RAF-induced lung adenomas is increased in mice with a disrupted PPARbeta/delta gene. *Int J Oncol.* 2007;31:607-11.

Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res.* 1985;57:794-800.

Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty A, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension.* 1996;28:505-506.

Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, Oelze M, Skatchkov M, Warnholtz A, Duncker L, Meinertz T, Forstermann U. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000; 86:E7-12.

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.

Nadar S, Blann AD, Lip GY. Antihypertensive therapy and endothelial function. *Curr Pharm Des.* 2004;10:3607-14.

Nagao T and Vanhoutte PM. Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. *Br J Pharmacol.* 1992;107:1102-1107.

Nakano D, Itoh C, Ishii F, Kawanishi H, Takaoka M, Kiso Y, Tsuruoka N, Tanaka T, Matsumura Y. Effects of sesamin on aortic oxidative stress and endothelial dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2003;26:1701-5.

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:10045-8.

Nava E, Farre AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, Luscher TF. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 1998;16:609-615.

Newaz M, Blanton A, Fidelis P, Oyekan A. NAD(P)H oxidase/nitric oxide interactions in peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha-mediated cardiovascular effects. *Mutat Res.* 2005;579:163-71.

Nicod L, Rodriguez S, Jacqueson A, Viollon-Abadie C, Berthelot A, Richert L. Clofibrilic acid or diethylmaleate supplemented diet decrease blood pressure in DOCA-salt treated male Sprague Dawley rats--relation with liver antioxidant status. *Mol Cell Biochem.* 2000;213:65-73.

Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH, Scivoletto R. Chronic but not acute treatment with hydralazine reverses the decreased endothelium-dependent responses in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 1989;11:573-586.

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD. The p67phox activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b (558). *J Biol Chem.* 1999;274:22999-3005.

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.

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.

Nunes VW, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH, Zorn TM, Scivoletto R. Influence of enalapril on the endothelial function of DOCA-salt hypertensive rats. *Gen Pharmacol*. 2000;34:117-125.

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.

Ogata T, Miyauchi T, Sakai S, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Yamaguchi I. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats is ameliorated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate, partly by suppressing inflammatory responses associated with the nuclear factor-kappa-B pathway. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1481-8.

Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium*. 2004;11:123-32.

Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Saruta T. Effect of nonpeptide vasopressin receptor antagonists on developing, and established DOCA-salt hypertension in rats. *Hypertension*. 1975;17:469-483.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963;27:282-293.

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*. 1998;101:1354-61.

Oliver Jr WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor α promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:5306-11.

Pagano, P.J.; Clark, J.K.; Cifuentes-Pagano, M.E.; Clark, S.M.; Callis, G.M.; Quinn, M.T. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:14483-14488.

Palloshi A, Fragasso G, Piatti P, Monti LD, Setola E, Valsecchi G, Galluccio E, Chierchia SL, Margonato A. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. *Am J Cardiol*. 2004;93:933-5.

Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1993;87:1468-1474.

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.

Passauer J, Bussemaker E, Lassig G, Gross P. Kidney transplantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with endstage renal disease. *Transplantation*. 2003;75:1907-10.

Patriarca P, Cramer R, Marussi M, Rossi F, Romeo D. Mode of activation of granule bound NADPH oxidase in leucocytes during phagocytosis. *Biochim Biophys Acta*. 1991;237:335-8.

Pedro-Botet J, Covas MI, Martín S, Rubiés-Prat J. Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2000;14:343-5.

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

Pershad Singh HA, Szollosi J, Benson S, Hyun WC, Feuerstein BG, Kurtz TW. Effects of ciglitazone on blood pressure and intracellular calcium metabolism. *Hypertension* 1993; 21:1020-3.

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104:191-6.

Perticone F, Maio R, Tripepi G, Zoccali C. Endothelial dysfunction and mild renal insufficiency in essential hypertension. *Circulation*. 2004;110:821-5.

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.

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.

Pialat JB, Cho TH, Beuf O, Joye E, Moucharrafié 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.

Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, Alfranca A, Redondo JM, Hatae T, Tanabe T, Warner TD, Bishop-Bailey D. Activation of PPARbeta/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.

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.

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

Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor α activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signalling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998;273:32833-32841.

Pu Q, Touyz RM, Schiffrin EL. Comparison of angiotensin-converting enzyme (ACE), neutral endopeptidase (NEP) and dual ACE/NEP inhibition on blood pressure and resistance arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens.* 2002;20:899-907.

Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel JB. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274:C214–20.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92:829-39.

Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW. C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:995-1001.

Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol*. 2003;91:19H-24H.

Radaelli A, Mircoli L, Mori I, Mancia G, Ferrari AU. Nitric oxide dependent vasodilation in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:735-739.

Rajagopalan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B.A.; Griendling, K.K.; Harrison, D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 1996;97:1916-1923.

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.

Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*. 1992;70:593-599.

Rao GN, Katki KA, Madamanchi NR, Wu Y, Birrer MJ. JunB forms the majority of the AP-1 complex and is a target for redox regulation by receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonists in smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999;274:6003-10.

Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109:217-26.

Redon J, Oliva NR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. *Hypertension*. 2003;41:1096-101.

Reid JK, Zivin JA, Kopin I. Central and peripheral adrenergic mechanisms in the development of deoxycorticosterone-saline hypertension in rats. *Circ Res*. 1975;37:569-579.

Reilly SM, Lee CH. PPAR delta as a therapeutic target in metabolic disease. *FEBS Lett*. 2008;582:26-31.

Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ. Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91phox. *Circulation*. 2002;106:2497-502.

Richer C, Doussau MP, Giudicelli JF. Effects of captopril and enalapril on regional vascular resistance and reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1983;5:312-320.

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.

Risérus U, Sprecher D, Johnson T, Olson E, Hirschberg S, Liu A, Fang Z, Hegde P, Richards D, Sarov-Blat L, Strum JC, Basu S, Cheeseman J, Fielding BA, Humphreys SM, Danoff T, Moore NR, Murgatroyd P, O'Rahilly S, Sutton P,

Willson T, Hassall D, Frayn KN, Karpe F. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes*. 2008;57:332-9.

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.

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.

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, Chiurlia E, Nuzzo A, Cioni E, Origliani G, Modena MG. Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1636-40.

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.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol*. 1986;250:H815-821.

Ruetten H, Zabel U, Linz W, Schmidt HH. Downregulation of soluble guanylyl cyclase in young and aging spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1999;85:534-41.

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.

Saavedra JM, Groebeck H, Axelrod J. Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ Res*. 1978;42:529-534.

Saito N, Mukaino S, Ogino K, Kawai C. Vascular lesions in hypertensive rats under salt loading: kidney renin and lysosomal enzymes. *Clin Sci Mol Med Suppl*. 1976;3:49s-51s.

Saito S, Hirata Y, Emori T, Imai T, Marumo F. Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors. *Hypertens Res.* 1996;19:201-6.

Sakurai T and Goto K. Endothelins. Vascular actions and clinical implications. *Drugs.* 1993;46:795-804.

Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MA, Fukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y. Expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists. *Br J Cancer.* 2000;83:1394-400.

Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;101:1899-906.

Schenk J, McNeill JH. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1992;27:161-170.

Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res.* 2000;87:1195-201.

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, Parent A, St Louis J, Tremblay J, Garcia R, Thibault G. Vascular atrial natriuretic factor receptors in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1992;26:857-864.

Schiffrin EL, Park JB, Pu Q. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens.* 2002a;20:71-8.

Schiffrin EL, Pu Q, Park JB. Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2002b;15:105-10.

Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1037-H1043.

Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens.* 2004;17:1192-200.

Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vasc Pharmacol.* 2005;43:19-29.

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.

Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, Granger JP. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. *Hypertension.* 2003;42:806-10.

Seifi B, Kadkhodae M, Karimian SM, Zahmatkesh M, Shams S, Bakhshi E. Reduction of kidney damage by supplementation of vitamins C and E in rats with deoxycorticosterone salt-induced hypertension. *Iran J Kidney Dis.* 2009;3:197-202.

Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:16047-52.

Seyle H, Hall CE, Rowley EM. Malignant hypertension produced by treatment with desoxycorticosterone acetate and sodium chloride. *Can. Med Assoc.* 1943;49:88-92.

Seyle H, Hall CE. Pathologic changes induced in various species by overdosage with desoxycortisone. *Arch. Pathol.* 1943;36:19-31.

Seyle H, Hall, CE. Production of nephrosclerosis and cardiac hypertrophy in the rat by desoxycorticosterone acetate overdosage. *Am. Heart J.* 1944;27:338-344.

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.

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.

Shimaya A, Kurosaki E, Shioduka K, Nakano R, Shibasaki M, Shikama H. YM268 increases the glucose uptake, cell differentiation, and mRNA expression of glucose transporter in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res.* 1998;30:543-8.

Shureiqi I, Jiang W, Zuo X, Wu Y, Stimmel JB, Leesnitzer LM, Morris JS, Fan HZ, Fischer SM, Lippman SM. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:9968-9973.

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.

Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation*. 2000;101:1722-8.

Soutoglou E, Viollet B, Vaxillaire M, Yaniv M, Pontoglio M, Talianidis I. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *EMBO J*. 2001;20:1984-92.

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.

Stahn C, Buttgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4:525-33.

Stephen RL, Gustafsson MC, Jarvis M, Tatoud R, Marshall BR, Knight D, Ehrenborg E, Harris AL, Wolf CR, Palmer CN. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2004;64:3162-3170.

Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:339-359.

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-54.

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schombein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995;25:1083-1089.

Swingle WT, Haller HL, Siegler EH, Swingle MC. A chinese insecticidal plant, *tripterygium wilfordii*, introduced into the united states. *Science*. 1941;93:60-61.

Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, Sierra ML, LeGrumelec C, Xu HE, Montana VG, Lambert MH, Willson TM, Oliver WR Jr, Sternbach DD. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)--synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13:1517-21.

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.

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.

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.

Takeda K, Bunag RD. Augmented sympathetic nerve activity and pressor responsiveness in DOCA hypertensive rats. *Hypertension*. 1980;2:97-101.

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 delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:15924-15929.

Thorn, G.W., Dorrance, S.S., DAY, E. Addison's disease: evaluation of synthetic desoxycorticosterone acetate therapy in one hundred and fifty-eight patients. *Ann. Intern. Med.* 1942;16:1053-1096.

Thorup C, Kornfeld M, Goligorsky MS, Moore LC. AT1 receptor inhibition blunts angiotensin II-stimulated nitric oxide release in renal arteries. *J Am Soc Nephrol Suppl.* 1999;10:S220-4.

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.

Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG. Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:373-83.

Torra IP, Chinetti G, Duval C, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:245-54.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res.* 2002;90:1205-13.

Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2004;22:1141-1149.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signalling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004;44:248-52.

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.

Trippodo NC, Walsh GM, Frohlich ED. Fluid volumes during onset of spontaneously hypertension in rats. *Am J Physiol*. 1978;235:H52-H55.

Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF, 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, Littlewood 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.

Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999;100:1223-9.

Uddin M, Yang H, Shi M, Polley-Mandal M, Guo Z. Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:811-7.

Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension.* 2003;41:534-9.

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. Novel role of gp91phox-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res.* 2002;91:1160-7.

Vamecq J, Draye JP. Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation. *Essays Biochem.* 1989;24:115-225.

van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S, Staels B, Groot PH, Groen AK, Kuipers F. Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res.* 2005;46:526-34.

Van Huysse JW. Endogenous brain Na pumps, brain ouabain-like substance and the $\alpha 2$ isoform in salt-dependent hypertension. *Pathophysiology.* 2007;14:213-220.

Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM and Houston DS. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:307-320.

Vargas FF, Caviedes PF and Grant DS. Electrophysiological characteristics of cultured human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res.* 1994;47:153-165.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P. The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic Res.* 2003;37:121-7.

Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, Boroujerdi-Rad L, Sindhu RK. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003;63:179-85.

Vaziri ND, Wang XQ. cGMP-mediated negative-feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide. *Hypertension.* 1999;34:1237-1241.

Vera R, Galisteo M, Villar IC, Sanchez M, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Soy isoflavones improve endothelial function in spontaneously hypertensive rats in an estrogen independent manner: role of nitric oxide synthase, superoxide, and cyclooxygenase metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:1300-1309.

Versteeg DH, Palkovits M, Van der Gungten, Wijnen HL, Smeets GW, de Jong W. Catecholamine content of individual brain regions of spontaneously hypertensive rats (SH rats). *Brain Res.* 1976;112:429-434.

Viel EC, Benkirane K, Javeshghani D, Touyz RM, Schiffrin EL. Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295:H281-8.

Viridis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension.* 2009;53:1008-1016.

Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens.* 2004;22:535-42.

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.

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.

Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994;32:5-8.

Wang Q, Liu M, Mullah B, Siderovski DP, Neubig RR. Receptor-selective effects of endogenous RGS3 and RGS5 to regulate mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2002;277:24949-24958.

Wang Y-X, Lee C-H, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003;113:159-70.

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.

Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Bohm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:300-5.

Wedgwood S and Black SM. Induction of apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells by a combined superoxide dismutase/catalase mimetic. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:L305-12.

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.

Welch WJ, Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney Int*. 2001;59:1257-63.

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.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD and Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*. 2000;43:527-50.

Winternitz SR, Katholi RE, Oparil S. Role of the renal sympathetic nerves in the development and maintenance of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *J Clin Invest.* 1980;66:971-8.

Wong MS, Man RY, Vanhoutte PM. Calcium-independent phospholipase A(2) plays a key role in the endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H1260-6.

Wong PC, Price WA Jr, Chiu AT, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, Wexler RR, Timmermans PB. Hypotensive action of DuP 753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension.* 1990;15:459-468.

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.

Wu, R.; Millette, E.; Wu, L.; de Champlain, J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* 2001;19:741-748.

Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 2002; 105:387-92.

Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, Campo LD, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M, Balfagón G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2008;154:1225-1235.

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.

Xu L, Han C, Lim K and Wu T: Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*.2006;66:11859-11868.

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 J, Yamane Y, Umeda Y, Yoshioka T, Nakai M, Ikeda M. Cardiovascular hemodynamics and vasopressin blockade in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 1984;6:397-407.

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. 1996;271:3221-8.

Yang D, Félétou M, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension*. 2003;41:143-148.

Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte PM, Félétou M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas

from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004;18:321-326.

Yang XY, Yang TT, Schubert W, Factor SM, Chow CW. Dosage-dependent transcriptional regulation by the calcineurin/NFAT signaling in developing myocardium transition. *Dev Biol.* 2007;303:825-37.

Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Watanabe T, Yoshikawa J, Asada A. Effects of carvedilol on oxidative stress in polymorphonuclear and mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Am J Med.* 2004;116:460-5.

Yemane H, Busauskas M, Burris SK, Knuepfer MM. Neurohumoral mechanisms in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension in rats. *Exp Physiol.* 2010;95:51-5.

Yin Y, Russell RG, Dettin LE, Bai R, Wei ZL, Kozikowski AP, Kopelovich L, Glazer RI. Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005;65:3950-3957.

Yoshikawa T, Brkanac Z, Dupont BR, Xing GQ, Leach R.J, Detera-Wadleigh SD. Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2, *Genomics* 1996;35:637-638.

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.

Yu M, Gopalakrishnan V, McNeill JR. Role of endothelin and vasopressin in DOCA-salt hypertension. *Br J Pharmacol.* 2001a;132:1447-1454.

Yue TL, Nerurkar SS, Bao W, Jucker BM, Sarov-Blat L, Steplewski K, Ohlstein EH, Willette RN. In vivo activation of peroxisome proliferator-activated receptor-delta protects the heart from ischemia/reperfusion injury in Zucker fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325:466-474.

Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. *Auton Neurosci.* 2002;98:24-27.

Zarzuelo MJ, Jiménez R, Galindo P, Sánchez M, Nieto A, Romero M, Quintela AM, 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;58:733-43.

Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, Vaziri ND. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant rich diet. *J Hypertens.* 2004;22:2025-33.

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.

Zhang X, Li H, Jin H, Ebin Z, Brodsky S, Goligorsky MS. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F671-8.

Zhao, X., Gu, Z., Attele, A.S., Yuan, C.S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J. Ethnopharmacol.* 1999;67:279-285.

Zheng JS, Yang XQ, Lookingland KJ, Fink GD, Hesslinger C, Kapatos G, Kovesdi I, Chen AF. Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension. *Circulation.* 2003;108:1238-45.

Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension.* 2004;44:186-90.

Zhou Y, Luo P, Chang HH, Huang H, Yang T, Dong Z, Wang CY, Wang MH. Colfibrate attenuates blood pressure and sodium retention in DOCA-salt hypertension. *Kidney Int.* 2008;74:1040-8.

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.

Zicha J, Kunes J, Lebl M, Pohlova I, Slaninova J, Jelinek J. Antidiuretic and pressor actions of vasopressin in age-dependent DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1989;256:R138-R145.