

Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas



**“ESTUDIO DE MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL
SÍNDROME METABÓLICO: EVALUACIÓN DE LA VÍA RHOA/ROCK
COMO POSIBLE EJE DE SEÑALIZACIÓN”**

ALBERTO ANDRÉS LEGUINA RUZZI

Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Médicas

Director de la tesis:

Dra. Claudia Sáez PhD. Dpto. de Hematología-Oncología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile

Co-director de la tesis:

Dra. Victoria Velarde PhD. Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile

Octubre 2015

Pontificia Universidad Católica de Chile
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas



**“ESTUDIO DE MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL
SÍNDROME METABÓLICO: EVALUACIÓN DE LA VÍA RHOA/ROCK
COMO POSIBLE EJE DE SEÑALIZACIÓN”**

ALBERTO ANDRÉS LEGUINA RUZZI

Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Médicas

Profesores guía:

Dra. Claudia Sáez PhD. Dpto. de Hematología-Oncología, Facultad de Medicina, P. Universidad Católica de Chile

Dra. Victoria Velarde PhD. Dpto. de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile

Comisión de tesis: **Dra. Mónica Acevedo**

Dra. Dolores Busso

Dr. Iván Palomo

Dr. Jaime Pereira

Octubre 2015



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
Dirección de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina

La Comisión Examinadora, constituida por los Profesores abajo firmantes, aprueba la Defensa Pública de la Tesis Doctoral titulada:

“ESTUDIO DE MARCADORES DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN EL SÍNDROME METABÓLICO: EVALUACIÓN DE LA VÍA RHOA/ROCK COMO POSIBLE EJE DE SEÑALIZACIÓN”

Aprobación Defensa Pública:

SR. ALBERTO LEGUINA RUZZI

Calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral, con nota

..... ()

Dr. José Francisco Miquel
Director de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina PUC

Dr. Luis Ibáñez A.
Decano
Escuela de Medicina PUC

Dra. Claudia Sáez
Subjefe, Director de Tesis
Programa Doctorado en Ciencias Médicas
Escuela de Medicina PUC

Dr. Jaime Pereira
Jefe
Programa Doctorado en Ciencias Médicas
Escuela de Medicina PUC

Dra. Victoria Velarde
Co-director de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas PUC

Dr. Iván Palomo
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Talca

Dra. Mónica Acevedo
Profesor Evaluador Interno
Escuela de Medicina PUC

Dra. Dolores Busso
Profesor Evaluador Interno
Escuela de Medicina PUC

Santiago, 7 de octubre de 2015

©2015, Alberto Leguina Ruzzi

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica que acredita al trabajo y a su autor.

**A mi mamá Lucia Ruzzi y al 2012
por hacer de mí, la persona que soy hoy**

AGRADECIMIENTOS

La realización de la presente tesis no hubiera sido posible sin la ayuda de la serie de personas que colaboraron a su exitoso desarrollo:

En primer lugar, agradezco a las Dras. Claudia Sáez y Victoria Velarde por aceptar la realización de mi tesis bajo su tutela y en sus laboratorios. Muchas gracias por el tiempo y energías invertidas en mi formación, las discusiones científicas, la inculcación de un espíritu crítico pero optimista y sobre todo por confiar en mí y ampararme bajo circunstancias difíciles. Ustedes devolvieron la fe en mí y aprendí a creer en mis capacidades. Muy en especial le agradezco al Dr. Jaime Pereira que se convirtió en un tercer tutor de esta tesis, para mí fue un honor y estaré eternamente agradecido por su comprensión y por confiar en mí durante una etapa complicada de mi vida.

Agradezco también a todos mis amigos y compañeros de laboratorio, de quienes aprendí y con quienes compartí muchas experiencias enriquecedoras: Karla Pereira, Valerie Decap, Estefanía Peñaloza, Gustavo Soto, Diego Romero, Macarena Palominos, Cecilia Alarcón, Patricia Hidalgo, Guillermo Valenzuela, Valeska Molina, Dra. Valeria Matus, Cesar González, Pablo Riquelme, Soledad Rodríguez, Eduardo Aranda, Paulina Arias, Blanca Muñoz, Elizabeth Araya, Sabine Belmont, Olga Panes y Dr. Diego Mezzano. Agradezco también a todo el personal del laboratorio de Anatomía Patológica, quienes facilitaron el trabajo del día a día: Dr. Juan Carlos Roa, Diego Romero y Romina Reyes. A mis amigos y compañeros de ciencia Ignacio Retamal, Mariana Acuña, Rina Ortiz y Carolina Cabeza, por haber compartido esta aventura durante los años. A mis amigos de vida, quienes me han contenido y soportado: Roberto Cortés, Sebastián Vera, Pablo Andulce y Ariana Riquelme.

Mi eterna gratitud al programa PentaUC y a sus alumnos, quienes me han dado esperanza en el futuro y me han enseñado la importancia de la docencia. A la Dra. Carolina Serrano por abrirme las puertas de sus cursos para trabajar como ayudante, fue un honor ser parte de su equipo y por creer en mis capacidades.

Agradezco a la Dra. Mónica Acevedo, Dra. Dolores Busso, Dr. Iván Palomo y Dr. Jaime Pereira, miembros de la comisión de tesis, por su buena disposición, apoyo y guía durante estos años, que resultó fundamental para el adecuado desarrollo del presente

trabajo. Quiero agradecer al Dr. José Chianale, a la Dra. Mirentxu Iruretagoyena, Bernardita Navarrete, Pilar Vinagre y Debbi Meza por toda su colaboración.

Agradezco también a las fuentes de financiamiento del presente trabajo, los proyectos Puente, FONDECYT 1141051, VRI y DRI. Mi financiamiento fue posible gracias a las becas de doctorado de CONICYT y de la Facultad de Medicina de la P. Universidad Católica de Chile. También quisiera agradecer a los laboratorios que me han recibido en el extranjero: Dra. Lindsay McDermott (King College, Inglaterra), Dra. Yumiko Oishii-Tanaka (Tokyo Medical and Dental University, Japón), Dr. Sun Sik Bae (Pusan National University, Sur Corea), Dr. Jong-Sup Bae (Kyungpook National University, Sur Corea) y en especial al Dr. Yokomizo Takehiko (Juntendo University, Japón) quien ha confiado en mis capacidades y su ayuda intelectual ha sido crucial para continuar en el camino de la ciencia.

Finalmente agradezco a mi familia, mi mamá Lucia Ruzzi, mis hermanos Adrián Leguina, Angelo Leguina y mi papá Guillermo Leguina quienes me han apoyado, alentado y querido a pesar de todos los obstáculos encontrados. También quiero agradecer al 2012, que me entregó una lección de vida que jamás olvidaré y me formó como la persona que soy ahora.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	CONTENIDOS	PÁGINA
	Agradecimientos	2
	Índice de Contenidos	4
	Índice de Figuras	7
	Índice de Tablas	9
	Abreviaturas	10
	Resumen	15
	<i>Abstract</i>	18
1	Introducción	21
1.1	Síndrome metabólico	21
1.2	La triada clásica del Síndrome Metabólico	22
1.2.1	Obesidad	22
1.2.2	Diabetes tipo 2	23
1.2.3	Hipertensión	24
1.3	Moléculas circulantes en sujetos con síndrome metabólico	25
1.3.1	Ácido Palmítico	26
1.3.2	IL-6	27
1.3.3	Insulina	28
1.4	Disfunción endotelial y aterogénesis	29
1.5	RhoA/ROCK como eje de señalización central en la disfunción endotelial	30
1.6	Asociación entre RhoA/ROCK, DE y SM	32
1.7	Intervenciones terapéuticas en SM	33
1.8	Formulación del problema	33
2.	Hipótesis y objetivos	34
3.	Materiales y Métodos	36
3.1	Sujetos de estudio y diseño experimental del objetivo 1	36
3.1.1	Determinaciones de Laboratorio	36
3.1.2	Generación de trombina	37
3.1.3	Determinación de la actividad de RhoA/ROCK en leucocitos	38
3.1.4	Perfil <i>Fatty Acids Methyl Esters</i> (FAME)	38
3.2	Preparación de HUVEC y diseño experimental del objetivo 2	39
3.2.1	Inmunofluorescencia y tinciones en células	39
3.2.2	Citometría de flujo	40
3.2.3	Actividad pro-coagulante en lisados celulares	40
3.2.4	Adhesión plaquetaria a la superficie de HUVEC en ensayo estático	41

3.2.4.1	Obtención de plaquetas lavadas	41
3.2.4.2	Ensayo de adhesión	41
3.3	Modelo animal Síndrome Metabólico y diseño experimental del objetivo 3	42
3.2.1	Medición de parámetros fisiológicos	42
3.2.2	Mediciones en suero	42
3.2.3	Determinaciones en tejidos	43
3.3.1	Histoquímica en aortas, corazón y riñón	43
3.4	Electroforesis y Análisis por Western Blot	44
3.5	Medición de Óxido Nítrico	45
3.6	Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo	45
3.7	Medición de marcadores inflamatorios y de disfunción endotelial	46
3.8	Determinación de la actividad de MMP2 y MMP9	46
3.9	Medición de triglicéridos en modelo <i>in-vitro</i> e <i>in-vivo</i>	47
3.10	Análisis estadístico	47
4.	Resultados	48
4.1	Objetivo 1	48
4.1.2	Marcadores de inflamación y estrés oxidativo	48
4.1.3	Marcadores de disfunción endotelial	50
4.1.4	Actividad de RhoA/ROCK en sujetos con SM y controles	50
4.1.5	Perfil de Ácidos Grasos	50
4.2	Objetivo 2	53
4.2.1	Activación de RhoA/ROCK	53
4.2.2	Activación de Akt y ERK	53
4.2.3	Niveles de óxido nítrico y actividad de eNOS	54
4.2.4	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en HUVEC	57
4.2.5	Estructura y morfología celular	59
4.2.6	Niveles de Factor von Willebrand liberado y exposición de fibras en la superficie celular	62
4.2.7	Actividad pro-coagulante en HUVEC y adhesión plaquetaria a células endoteliales	62
4.2.8	Niveles de MCP-1, sICAM-1, ácido úrico en sobrenadante y E-Selectina en lisados	65
4.2.9	Almacenamiento de colesterol, lípidos neutros y triglicéridos en HUVEC	68
4.3	Objetivo 3	68
4.3.1	Efecto de la dieta alta en grasa	72
4.3.2	Marcadores de estrés oxidativo, de inflamación y de disfunción endotelial	76
4.3.3	Activación de vías de señalización RhoA/ROCK, PI3K/Akt, MAPK/ERK y actividad de MMP 2 y 9 en aortas	76
4.3.4	Histología de aortas, corazones y riñones	85

5	Conclusiones y discusión	86
5.1	RhoA/ROCK	89
5.2	Estrés oxidativo y óxido nítrico	91
5.3	Inflamación	91
5.4	Metaloproteinasas	92
5.5	Estructura celular	93
5.6	Alteraciones pro-trombóticas	94
5.7	Otros marcadores encontrados en etapas subclínicas de SM	96
5.8	Observaciones finales	98
6	Actividades y logros	100
7	Referencias	103

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDOS	PÁGINA
Esquema 1 Vías de señalización del receptor de insulina en estado fisiológico y patológico	29
Esquema 2 A) Vía de señalización RhoA/ROCK en el endotelio y su efecto sobre la producción de NO y ROS. B) Modelo de las implicancias cardiovasculares de la vía RhoA/ROCK y los componentes que inducen la disfunción endotelial	32
Esquema 3 Curva estándar de generación de trombina	37
Figura 1 Activación de RhoA/ROCK en leucocitos y actividad de MMPs en suero de sujetos con SM	51
Figura 2 Perfil de FAME	52
Figura 3 Activación de RhoA/ROCK, Akt y ERK en HUVEC estimuladas por 2, 5, 8 y 24 horas	55
Figura 4 Niveles de Óxido Nítrico y actividad de eNOS en HUVEC estimuladas por diferentes tiempos	56
Figura 5 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en HUVEC estimuladas por 2, 5, 8 y 24 horas	58
Figura 6 Morfología celular en HUVEC estimuladas por 24 horas	60
Figura 7 Actividad de MMP2 y MMP9	61
Figura 8 Niveles de Factor von Willebrand soluble y exposición de fibras en la superficie celular	63
Figure 9 Actividad pro-coagulante en HUVEC estimuladas por 24 horas y adhesión plaquetaria	64
Figure 10 La estimulación por 24 horas con IL-6, AP e Insulina incrementa los niveles de MCP-1, sICAM-1 y ácido úrico en sobrenadante, y E-selectina en lisados celulares	66
Figura 11 Almacenamiento de colesterol, lípidos neutros y triglicéridos en HUVEC.	67
Figura 12 Masa corporal	69
Figura 13 Ganancia de peso	69
Figura 14 Tasa de alimentación	69
Figura 15 Glicemia, Insulinemia y HOMA-IR	70
Figura 16 Triglicéridos y Colesterol Total	70

Figura 17	Tejido Adiposo Extra-peritoneal y Circunferencia Abdominal	71
Figura 18	Presión Arterial Sistólica, Ácido Úrico y Creatinina	73
Figura 19	Marcadores de Estrés Oxidativo	74
Figura 20	Marcadores de Inflamación y Disfunción Endotelial	75
Figura 21	Niveles de Óxido Nítrico circulantes y actividad de eNOS en aorta	78
Figura 22	Vías de Señalización y MMPs en aortas	79
Figura 23	Morfología de la Aorta	80
Figura 24	Infiltración y contenido graso de la aorta	81
Figura 25	Fibrosis cardiaca	84

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDOS	PÁGINA
Tabla 1 Características clínicas, bioquímicas y antropométricas de la población estudiada	49
Tabla 2 Marcadores estrés oxidativo e inflamación	49
Tabla 3 Marcadores de disfunción endotelial	51

ABREVIATURAS

µg	:	Microgramo
µM	:	Micromolar
µL	:	Microlitro
Akt	:	Proteína quinasa B
AngII	:	Angiotensina II
ASK-1	:	Quinasa reguladora de señal apoptótica 1
ASP	:	Proteína estimuladora de la acilación
AT-1	:	Receptor de angiotensina 1
AP	:	Ácido palmítico
APC	:	Actividad pro-coagulante
AOPP	:	Productos proteicos de oxidación avanzada
ATPIII	:	Panel de tratamiento del adulto III
BrEt	:	Bromuro de etidio
cAMP	:	Adenosín monofosfato cíclico
cGMP	:	Guanosín monofosfato cíclico
sCD40L	:	Ligando <i>cluster</i> de diferenciación 40 soluble
cms	:	Centímetros
dL	:	decilitros
DE	:	Disfunción endotelial
DCF-DA	:	Dihydro-Chloro fluorescein diacetato
DHA	:	Ácido docosehaxenoico
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
ECA	:	Enzima convertidora de angiotensina
ECV	:	Enfermedad cardiovascular
EE	:	Error estándar
EGTA	:	Ácido etilen glicol tetracético
EPA	:	Ácido eicosapentanoico
eNOS	:	Óxido nítrico sintasa endotelial

E-Selectin	:	Selectina endotelial
EPA	:	Ácido eicosapentanoico
ERK	:	Quinasa reguladas por señalización Extracelular
ET-1	:	Endotelina 1
ETP	:	Potencial endógeno de trombina
Etd	:	Etidio
FABP4	:	Proteína de anclaje de ácidos grasos 4
FAD	:	Flavin adenine dinucleotide
FAME	:	Fatty Acid Methyl Ester
FAT/CD36	:	Traslocasa de ácidos grasos/ <i>Cluster</i> de diferenciación 36
FBS	:	Suero fetal de bovino
FDA	:	Administración de drogas y alimentos
FFA	:	Ácidos grasos libres
FT	:	Factor tisular
FV	:	Factor de coagulación 5
FVIIa	:	Factor de coagulación 7 activado
FX	:	Factor de coagulación 10
FXa	:	Factor de coagulación 10 activado
g	:	Gramo
GAP	:	Proteína activadora de GTPasa
GEF	:	Factor intercambiador de nucleótido guanina
GLU	:	Glucosa
gp130	:	Glicoproteína 130
h	:	Hora
HDL-c	:	Lipoproteína de alta densidad
HF diet	:	Dieta alta en grasa
HMGCoA reductasa	:	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HTA	:	Hipertensión arterial
HUVEC	:	Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ICAM-1	:	Molécula de adhesión intracelular 1
IGF-1	:	Factor de crecimiento similar a insulina 1

IL-1 β	:	Interleucina 1 β
IL-6	:	Interleucina 6
IL-6R	:	Receptor de interleucina 6
IKK β	:	Inhibidor de la quinasa de kappa B
IR	:	Receptor de insulina
IRS	:	Sustrato del receptor de insulina
JNK	:	Quinasa jun N-terminal
kDa	:	Kilo Dalton
L	:	Litro
L-Arg	:	L-Arginina
L-Cit	:	L-Citrulina
LDL-c	:	Lipoproteína de baja densidad
LF diet	:	Dieta baja en grasa
LPA	:	Ácido lisofosfatídico
M	:	Molar
MCP-1	:	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
mg	:	Miligramos
min	:	Minuto
mL	:	Mililitro
MLC	:	Cadena liviana de la miosina
mM	:	MiliMolar
mm	:	Milímetro
mmHg	:	Milímetros de mercurio
MMPs	:	Metaloproteinasas de matriz
mRNA	:	Acido ribonucleico mensajero
MYPT	:	Proteína blanco de la fosfatasa de miosina
NfkB	:	Factor nuclear potenciador de la cadena liviana kappa de células B activadas
ng	:	Nanogramo
MAPK	:	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK o MAPKK	:	Proteína quinasa de la quinasa activada por mitógenos

MYPT 1	:	Proteína blanco de la fosfatasa de miosina 1
mTOR	:	Blanco de rapamicina en mamífero
NEFA	:	Acidos grasos no esterificados
Nerf2	:	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
No-HDL-c	:	Colesterol no HDL
NOS	:	Óxido nítrico sintasa
ON	:	Óxido nítrico
ORO	:	Tinción “oil red o”
p-Akt	:	Proteína quinasa B fosforilada
p-eNOS	:	Óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada
p-ERK1/2	:	Quinasa regulada por señalización extracelular fosforilada
p-MYPT1	:	Proteína blanco de la fosfatasa de miosina 1 fosforilada
P-selectin	:	Selectina p
PA	:	Presión arterial
PAI-1	:	Inhibidor del activador de plasminógeno 1
PBS	:	Amortiguador fosfato salino
PDK-1	:	Quinasa dependiente de fosfoinositol 1
PGE ₂	:	Prostaglandina E ₂
PI3K	:	Fosfoinositol 3-quinasa
PKC	:	Proteína quinasa C
PTK	:	Proteína Tirosina Quinasa
PMSF	:	fenilmetilsulfonilfluoruro
PPAR	:	Receptores peroxisomales de proliferación nucleares
PPNa	:	Pirofosfato de Sodio
PPR	:	Receptor de proliferación peroxisomal
ProtS	:	Glicoproteína plasmática dependiente de vitamina K
PS	:	Presión sistólica
PVDF	:	Polivinilidenfluoruro
rpm	:	Revoluciones por minuto
Ras	:	Sarcoma de rata
Raf	:	Fibrosarcoma rapidamente acelerado

RhoA	:	Miembro A de la familia de genes homólogos a Ras
RNS	:	Especies reactivas de nitrógeno
ROCK	:	Proteínas quinasa asociada a Rho
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
SBTI	:	Inhibidor de tripsina del poroto de Soja
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
seg	:	Segundos
SH2	:	Dominio homólogo Src 2
sICAM-1	:	Molécula de adhesión intracelular-1 Soluble -1
SM	:	Síndrome Metabólico
SMC	:	Células de la musculatura lisa
SOS	:	Proteína Son of Sevenless
Src	:	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
STZ	:	Estreptozotocina
TBARS	:	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TEV	:	Tromboembolismo venoso
TG	:	Triglicéridos
TGF- β	:	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	:	Factor de Necrosis Tumoral α
VE-Caderina	:	Caderina de endotelio vascular
VCAM-1	:	Molécula de adhesión vascular 1
VLDL-c	:	Lipoproteína de muy baja densidad
FVW	:	Factor de von Willebrand
WB	:	Western Blot
WHO	:	World Health Organization
ZO-1	:	Zonula Occludens proteína 1

RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) es un agregado de condiciones cardio-metabólicas que en cronicidad involucra patologías tales como la obesidad, diabetes e hipertensión arterial (HTA), aumentando considerablemente el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV). La aterosclerosis es el denominador común de las patologías que desencadenan los eventos cardiovasculares y la disfunción endotelial (DE) es la alteración base del proceso aterosclerótico. La prevalencia mundial del SM ha aumentado progresivamente, alcanzando alrededor del 25% de la población adulta. Existen datos clínicos de una población mas joven que califica para SM por mostrar un aumento de la circunferencia de la cintura y sobrepeso junto con niveles elevados de triglicéridos plasmáticos. En este grupo de sujetos jóvenes con SM se desconoce la presencia de marcadores de daño endotelial e inflamatorios similares a los que presentan pacientes adultos sobre 50 años con diabetes tipo 2 e hipertensión. En este último grupo de adultos, se han reportado niveles elevados de citoquinas inflamatorias tales como IL-6, de ácidos grasos, específicamente el ácido palmítico (AP), hiper-insulinemia y alteraciones relacionadas con DE y, solo en un reporte, se ha mencionado la sobre-activación de la vía RhoA/ROCK.

En base a lo expuesto planteamos como hipótesis que: IL-6, insulina y AP son moléculas que se encuentran elevadas en sujetos con SM sin diabetes tipo 2 o hipertensión arterial, y pueden inducir DE mediada por la activación de RhoA/ROCK. Para poner a prueba nuestro postulado propusimos tres estrategias que involucran estudios *ex-vivo*, *in-vitro* e *in-vivo*.

Los estudios *ex-vivo* se realizaron en sujetos adultos jóvenes que consultaron por sobrepeso pero calificaron para SM por presentar aumento del contorno de cintura y dislipidemia. Nuestros resultados mostraron que el grupo de sujetos evaluado tiene, además de niveles de LDL-c elevados y HDL-c bajos, altos niveles de IL-6, insulina y AP, aumento de marcadores de DE tales como MCP-1, sICAM-1, aumento de marcadores de estrés oxidativo (AOPP y TBARS), menor biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) y una sobre activación de RhoA/ROCK en leucocitos en comparación a sujetos sanos. Aunque dentro de rango normales, se encontró además, mayores niveles plasmáticos de ácido úrico, menores niveles creatinina y un moderado estado de hiper-coagulabilidad en comparación con individuos controles.

El estudio *in-vitro* se llevó a cabo en células endoteliales de cordón umbilical estimuladas con concentración similares a las encontradas en sujetos con SM de IL-6, insulina y AP, con el objetivo de evaluar la participación de RhoA/ROCK en el daño endotelial inducido por estas moléculas. Los resultados mostraron que la combinación de IL-6, insulina y AP activa la vía RhoA/ROCK y altera la señalización de Akt y ERK. Adicionalmente, se reducen los niveles de ON y la actividad de eNOS, junto a un aumento de los niveles de marcadores de estrés oxidativo. Se observaron cambios en la estructura de actina y de VE-caderina y alteraciones en la citoarquitectura de la monocapa celular, acompañado de un aumento de la actividad de MMP9 intracelular. La triple estimulación aumentó la adhesión plaquetaria, la actividad pro-coagulante, la liberación de Factor de Von Willenbrand (FVW), MCP-1, siCAM-1, E-selectina y la acumulación intracelular de lípidos. Todas estas alteraciones a excepción de los niveles de FVW y la actividad pro-coagulante parecen ser mediadas por la sobre-activación de RhoA/ROCK ya que se evitaron al adicionar el inhibidor Y-27632.

La participación de RhoA/ROCK en relación a características de SM se evaluó en un modelo de ratas alimentadas con una dieta rica en AP por 14 semanas con y sin la administración de Fasudil, un inhibidor de RhoA/ROCK, por las dos últimas semanas. Los resultados muestran que la dieta alta en grasa indujo características SM tales como: sobrepeso, mayor circunferencia abdominal y dislipidemia. A las 14 semanas de dieta los animales tuvieron presión sistólica elevada, altos niveles de triglicéridos, colesterol y glicemia, en comparación a los animales controles pero dentro de los rangos de normalidad. La dieta alta en grasa indujo además altos niveles de insulina, IL-6, aumento de tejido adiposo extra-peritoneal, marcadores de estrés oxidativo (TBARS y AOPP), siCAM-1, sCD40L, ácido úrico y niveles reducidos de ON. La administración de Fasudil por dos semanas, revirtió las alteraciones observadas. El análisis de las aortas de los animales alimentados con dieta rica en AP muestra una mayor infiltración grasa y un aumento de la actividad de RhoA/ROCK, de E-selectina, una disminución de la actividad de Akt, eNOS y de los niveles de Nrf2 comparados con las aortas de los animales alimentados con dieta control. Los animales tratados con Fasudil mostraron una reducción de las alteraciones mencionadas. A pesar de la presencia de alteraciones metabólicas, la dieta alta en grasa no indujo diabetes ni HTA en los animales durante el periodo estudiado.

Consideramos que los resultados de esta tesis entregan evidencias sobre la participación de RhoA/ROCK en las alteraciones relacionadas a la DE asociadas a SM y demuestra el rol del AP, IL-6 e insulina como componentes que, al estar elevados en pacientes con SM, promueven DE.

Adicionalmente, creemos que los resultados obtenidos entregan información relevante para sujetos jóvenes con SM que, por no mostrar síntomas relacionadas con patologías tales como diabetes tipo 2 o hipertensión, desconocen que ya presentan signos relacionados con mayor riesgo cardiovascular.

ABSTRACT

The Metabolic syndrome (SM) is a cluster of cardiovascular risk factors that in chronicity could lead to pathologies such as obesity, diabetes and hypertension (HT), increasing the risk of cardiovascular disease (CVD).

Atherosclerosis is the common denominator of the cardiovascular pathologies and endothelial dysfunction (ED) is the base alteration leading to the atherosclerotic plaque formation. Currently, the MS prevalence has reached around 25% of the adult population. New evidence has emerged from a younger group that qualifies for MS for their enlarged waist circumference and overweight in addition to hypertriglyceridemia. It is unknown whether this group of young subjects show ED and inflammatory markers similar those adults over 50 years old with diabetes type 2 and hypertension. This group of adult patients showed elevated levels of inflammatory cytokines such as IL-6, free fatty acids, specifically palmitic acid (PA), hyperinsulinism and ED related alterations. Additionally, only one report has shown over activation of RhoA/ROCK in peripheral leukocytes of SM patients. Based on the above mentioned, our hypothesis is: IL-6, insulin and PA are molecules that are elevated in MS subjects without type 2 diabetes or HT and, induce ED through the RhoA/ROCK pathway activation. In order to demonstrate this hypothesis three experimental approaches involving *ex-vivo*, *in-vitro* and *in-vivo* studies.

For the *ex-vivo* studies we evaluated young adult subjects that qualified for MS due to their enlarged waist circumference and dyslipidemia. Our results showed that this group of subjects have elevated levels of LDL-c and low HDL-c. Additionally they present high levels of IL-6, insulin, PA, MCP-1 and sICAM-1 compared to controls. Elevated oxidative stress markers (AOPP and TBARS), as well as lower nitric oxide (NO) bioavailability and over activation of RhoA/ROCK in leukocytes was found in MS subjects compared to healthy controls. Even though uric acid and creatinine levels are within normal ranges, the MS subjects showed significantly different values to those found in healthy individuals. A slight hypercoagulability state was also found in the MS subjects, compared to the controls, as evidenced by an enhanced endogenous thrombin generation potential.

In-vitro studies were performed to elucidate the role of RhoA/ROCK in endothelial damage due to IL-6, PA and insulin stimulation at concentrations similar to those found in the subjects with MS. The results showed that IL-6, insulin and PA activate the RhoA/ROCK

pathway and alter the Akt and ERK signaling. Even more, the stimulation reduced the NO levels and eNOS activity, in addition to an increase in oxidative stress markers. Also, changes in the actin and VE-cadherine structure, disruption in the cellular monolayer and increase in the intracellular MMP9 activity were observed.

Furthermore, the triple stimulation increased the endothelial cells pro-coagulant activity, E-Selectin levels and the intracellular lipid accumulation as compared to non stimulated HUVEC. Higher release of the von Willebrand Factor (VWF), MCP-1 and siCAM-1 was also found in stimulated cells. In addition, the triple stimulation increased the number of platelets adhered to the endothelial cells.

All these alterations, with exception of VWF and the pro-coagulant activity, seemed to be mediated by the RhoA/ROCK activation because they did not occur when the cells are co-incubated with Y-27632 inhibitor.

The RhoA/ROCK role in the MS progression was evaluated in a rat model fed with high fat diet enriched in PA for 14 weeks, with or without the administration of a RhoA/ROCK inhibitor (Fasudil) for the last 2 weeks.

Our results showed that the high fat diet induced MS characteristics such as overweight, increased abdominal circumference and dyslipidemia. At 14 weeks, these animals presented higher systolic blood pressure, triglycerides, cholesterol and glycemia levels, compared to control animals. Additionally, the high fat diet induced higher levels of IL-6, more extra-peritoneal adipose tissue patches, elevated ED and oxidative stress markers, uric acid and lower levels of NO. Oral administration of Fasudil for 2 weeks was able to reverse all the alterations mentioned.

The analysis of the aortas of animals fed with high fat diet showed higher fatty infiltration and an over activation of RhoA/ROCK and lower activation of Akt, eNOS and Nrf2 compared to aortas from control animals, as well as elevated levels of E-Selectin. Two weeks of the Fasudil treatment reduced the alterations mentioned above. Interestingly, even when the high fat diet induced several alterations related to MS, these animals did not develop HT or diabetes during the studied time.

Together, the results obtained in this thesis provide evidence about the participation of RhoA/ROCK in the abnormalities associated with MS, and proved the role of PA, IL-6 and insulin in the pathogenesis of ED.

Additionally, we believe that our results provide relevant information for young subjects with MS that are not aware that already carry signs related with higher CVD risk because the lack of symptoms.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los países industrializados, acompañado de los avances tecnológicos, ha producido fuertes cambios sociales que afectan directamente nuestro estilo de vida. La dieta poco saludable, rica en grasas de origen animal y carbohidratos y el sedentarismo, definido como la carencia de ejercicio físico en la vida cotidiana, avanzan en paralelo a una serie de patologías emergentes, que se inician en etapas tempranas juveniles y que en su estado crónico, en ocasiones desatendidas clínicamente, aumentan significativamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) resultando en un incremento de la tasa de morbi-mortalidad (1). La asociación de factores cardio-metabólicos que compone las patologías bases para la enfermedad aterosclerótica genera una condición que se conoce como síndrome metabólico (SM).

1.1 Síndrome metabólico

El SM es un conjunto factores de riesgo cardio-metabólicos que se asocian, en su estado crónico, a un mayor riesgo de desarrollar ECV. Algunas de estas condiciones son la dislipidemia, que se asocia a una mayor acumulación de grasa abdominal, la HTA y una tolerancia a la glucosa alterada en conjunto a un ambiente inflamatorio (2).

La Organización Mundial de la Salud (WHO) y diversos programas internacionales, han definido de manera transversal en el SM, la existencia de un estado pro-trombótico, dislipidémico, una alteración en el metabolismo de la glucosa, un alza sostenida de la presión arterial, obesidad abdominal y un estado pro-inflamatorio sistémico (3).

En la última década ha habido una amplia discusión respecto al eje central del SM por lo que se han propuesto variantes para la definición clásica. El consenso actual señala que lo central en el SM es la obesidad, como factor gatillante de la resistencia a la insulina y la HTA. Más aún, el tratamiento ampliamente aceptado para el manejo de esta condición, se basa en la reducción del peso por medio de dieta y ejercicio (4). Una de las principales guías de diagnóstico del SM es el Adult Treatment Pannel III (ATPIII) del que se desprende el diagnóstico más reciente basado en el consenso de criterios armonizados, determinado por las principales sociedades internacionales de la salud. Esta guía define que sujetos con 3 o más características tales como, circunferencia abdominal > 90 cms, en hombres de etnia sudamericana, triglicéridos > 150mg/dL, HDL-c < 40mg/dL, presión

arterial sistólica ≥ 130 o diastólica ≥ 85 mmHg y glicemia en ayuna $> 100\text{mg/dL}$ se consideran dentro del grupo de sujetos con SM (5).

A nivel mundial, la prevalencia se ha estimado entre 20-30% (6). En Chile, Mujica y colaboradores, han documentado que la prevalencia en hombres y mujeres es sobre el 20%, siguiendo la tendencia internacional, donde se observa un aumento sostenido (7) que es preocupante.

1.2 La triada clásica del Síndrome Metabólico

Como fue mencionado anteriormente, el conjunto de factores de riesgo cardio-metabólico del SM, gira en torno a tres patologías: obesidad, diabetes tipo 2 y HTA. La trayectoria del SM es silenciosa y asintomática. El agregado de alteraciones cardio-metabólicas, iniciado por la acumulación de grasa abdominal, en su estado crónico predispone a un mayor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas de difícil manejo, como lo son la obesidad, diabetes tipo 2 e hipertensión (8).

El estudio del SM previo al desarrollo o a las manifestaciones clínicas de las patologías de difícil manejo, abre una importante oportunidad de intervención terapéutica, considerando que esto no ha sido estudiado en totalidad.

1.2.1 Obesidad

El principal factor patogénico en el SM es la obesidad abdominal, la que se ve determinada por la acumulación de tejido adiposo subcutáneo y visceral. Esta última característica jugaría un papel crucial en el desorden metabólico por la capacidad endocrina que presenta el tejido adiposo (9). Las bases celulares de la obesidad se explican por la hipótesis del “Síndrome de Almacenamiento de Grasa Ectópica” que sugiere que los adipocitos sufren hipertrofia a causa del límite de retención de lípidos que alcanzan, a su vez, la sobrecarga de grasa por vía dietaria se traslada a tejido no adiposo (músculo esquelético, páncreas, corazón, hígado) donde produce daño y lipotoxicidad, la que se puede ver exacerbada por la baja tasa de oxidación de la grasa en este tipo de tejido (10).

Considerando la capacidad endocrina del tejido adiposo, esta sobrecarga lipídica induciría un estado pro-inflamatorio y pro-aterogénico. Más aún, a nivel de músculo esquelético,

afectaría la acción de la insulina mientras que en el sistema cardiovascular, se ha encontrado una correlación entre tejido adiposo visceral y la DE (11).

El tejido adiposo secreta diversas hormonas, biomoléculas y péptidos, también llamadas “adipocitoquinas”, que incluyen citoquinas como la IL-6, triglicéridos y ácidos grasos libres que se mantienen circulantes y en contacto con el tejido vascular (12). El desbalance en estos mediadores genera un estado de inflamación sistémico en el sujeto obeso. Más aún, en etapas tempranas de sobrepeso ya se evidencia un alza en estos componentes, lo que podría relacionarse con un daño endotelial persistente, aumentando el riesgo de ECV (13).

Se postula que el rol de la obesidad es complejo y crítico en el SM, la hiperlipidemia presente en esta condición es un factor de riesgo clásico de la enfermedad cardiovascular, propiciando un medio pro-trombótico e inflamatorio (14). Con el fin de entender la progresión y participación de la obesidad, se han planteado modelos que integran diversos factores intrínsecos, como el envejecimiento, las fluctuaciones hormonales y otros externos, como el estrés, la dieta y el sedentarismo, que en conjunto favorecen el desarrollo de un estado inflamatorio lo que conlleva alteraciones metabólicas y daño cardiovascular (15, 16).

1.2.2 Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es un desorden multi-sistémico de la homeostasis energética, el crecimiento celular y la reparación de tejido. La resistencia a la insulina es el paso inicial a la diabetes tipo 2 y es un factor de riesgo crucial en el SM. Las personas que desarrollan diabetes tipo 2 usualmente pasan por una fase de excesiva adipogénesis (obesidad), hiperinsulinemia compensatoria, daño de las células beta pancreática que conlleva una disminución progresiva de la secreción de la insulina y un desbalance en los niveles de glucosa, lo que inicialmente se compensa por la hiper-secreción de insulina. Como manifestación más tardía se describe la hiperglicemia lo que finalmente diferencia a los sujetos con daño en la micro y/o macro vasculatura (17).

En la resistencia a la insulina, se reconocen dos fenómenos de interés que contribuyen activamente a la DE: la toxicidad causada por la hiper-insulinemia, que tiene una estrecha relación con el aumento de la expresión del receptor AT-1 y por consiguiente con la HTA en el SM, y la glucotoxicidad que se produce en etapas más tardías del desbalance (18). En

la pre-diabetes, uno de los primeros fenómenos es la alteración de la regulación de las vías de señalización clásicas de la insulina (Akt y MEK), las que afectan directamente al endotelio (19).

1.2.3 Hipertensión

Esta patología se caracteriza por un incremento continuo y sostenido de la presión arterial sistólica por sobre 140 mmHg y/o en la presión arterial diastólica por sobre los 90 mmHg (20). Más de un tercio de los sujetos con HTA sufren el conjunto completo de patologías asociadas al síndrome (21).

Existe una fuerte asociación entre la HTA, la obesidad visceral y la resistencia a la insulina. Es por esto que se han planteado modelos causa-efecto en los que la HTA se posiciona como una manifestación fisiopatológica cardiovascular del SM y por consiguiente, del daño endotelial (15, 16).

En la patogenia de la HTA, la acumulación de grasa visceral aportaría un ambiente pro inflamatorio rico en leptina, Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), angiotensinógeno, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y triglicéridos circulantes (22) los que directamente generan una hiperactividad simpática la que, a su vez, se regula por retroalimentación positiva con la activación del sistema renina-angiotensina, eje fundamental en la HTA (23). En estudios clínicos se ha demostrado que los NEFA aumentan la presión arterial, el ritmo cardíaco y actividad de los receptores α -1 adrenérgicos presentes en los vasos sanguíneos, mientras que reducen la sensibilidad del baro-reflejo y la vasodilatación dependiente de endotelio (24).

Por otro lado, en sujetos con resistencia a la insulina, el efecto anti-natriurético de la insulina estaría aumentado (25), más aún, se ha evidenciado que la reabsorción de sodio se encuentra aumentada por lo que se produciría una HTA sensible a la sal (26). Junto con esto, la hiperinsulinemia está asociada a un incremento en los niveles circulantes de endotelina-1 (ET-1) (27), elevados niveles de leptinas y NEFA que a su vez aumentan la actividad nerviosa simpática y disminuyen la producción de ON (28).

En el SM, previo al desarrollo de diabetes tipo 2 y con un sobrepeso cercano a la obesidad, se observa un cuadro pre-hipertensivo caracterizado por un leve aumento sostenido y asintomático de la presión arterial en valores que bordea 130 mmHg para la sistólica y 80

mmHg para la diastólica (20). Esta alza constituye un factor de riesgo a desarrollar HTA, por lo que intervenir en esta fase podría detener la progresión de la patología hipertensiva.

1.3 Moléculas circulantes en sujetos con síndrome metabólico

La triada anteriormente descrita corresponde al cuadro clásico con las patologías ya declaradas. En paralelo a esto se observan manifestaciones subclínicas que participan en el desarrollo de las alteraciones metabólicas presentes en el SM.

La experiencia clínica de especialistas chilenos, colaboradores de este proyecto, describe que un sujeto acude a una consulta médica inicial por la apreciación personal y/o de su entorno de un aumento significativo de peso y la necesidad de un chequeo rutinario. Los exámenes de laboratorio, con claras alteraciones en el perfil lipídico (por ejemplo, elevados triglicéridos y LDL-c), alertan aún más sobre la necesidad de consultar a un especialista, el que diagnostica clínicamente el SM de acuerdo a las guías previamente mencionadas. El grupo de sujetos estudiado en esta tesis no presenta las patologías declaradas como HTA y diabetes tipo 2 pero tiene sobrepeso y alteraciones en su perfil lipídico.

Considerando lo anteriormente expuesto, los estudios de la última década se han centrado en caracterizar al sujeto con SM en referencia a componentes plasmáticos que, por un lado, sean marcadores con valor diagnóstico pero a la vez sean componentes con participación activa en el daño sistémico. Uno de los principales trabajos que ha intentado caracterizar a los sujetos con SM, es el de Hung y colaboradores, en el que se evidenció que la alteración de los componentes lipídico (triglicéridos), pro-inflamatorio (IL-18 / IL-6) e insulinémico, entre otros, eran transversales a una población de más de 1000 individuos de diversas edades y que se correlacionaban positivamente con el aumento de características clínicas del cuadro patológico (29). Cabe destacar que estos estudios se han realizado en adultos sobre 45 años que ya presentan diabetes tipo 2 e HTA.

En el contexto del SM, la dieta rica en grasas, genera un aumento de triglicéridos circulantes, producto del metabolismo de los alimentos que consumimos. En estado crónico, esto predispone a un aumento en el tejido adiposo abdominal el que se metaboliza por medio de lipólisis de triglicéridos liberando ácidos grasos a la circulación. Estos pueden ser recapturados para ser sustrato energético o para formar otros ácidos grasos esenciales. El plasma contiene una amplia variedad de ácidos grasos de cadena larga, de los cuales el

35% son saturados y el 65% insaturados. Los efectos de éstos a nivel celular son variados, no obstante, el AP es regularmente usado para representar el efecto de los ácidos grasos saturados pro-aterogénicos a nivel celular (30).

En base a lo reportado por Hung y cols, enfocamos nuestros estudios en moléculas elevadas en el SM, representativas de tres componentes de la patología. La IL-6, como componente inflamatorio y la insulina, parte del desbalance en el metabolismo glucídico. Sumado a lo anterior y basados en una serie de reportes que indican la influencia del ácido palmítico (AP) elevado en el SM, incluimos a este ácido graso saturado como el componente lipídico a estudiar. En un modelo *in-vitro* de células endoteliales, estas tres moléculas fueron evaluadas por su capacidad de inducir daño endotelial mediado por RhoA/ROCK.

1.3.1 Ácido Palmítico

El AP es un ácido graso esencial saturado de 16 carbonos, presente en grandes cantidades en alimentos de origen animal y sus derivados (31). El consumo de productos tales como el queso, cecinas, carnes rojas y alimentos procesados altos en materia grasa, predisponen a una alta ingesta de AP. En trabajos recientes, se ha descrito que, en sujetos adultos mayores con SM, los niveles circulantes de AP se encuentran elevados (32), más aún, el ácido palmítico (AP) es el ácido graso más abundante en la circulación, en relación al total de fosfolípidos séricos (33).

El endotelio vascular se encuentra en contacto directo con este tipo de ácido graso, contando con la maquinaria de reconocimiento, internalización, y metabolización de lípidos (vía CD36, “Fatty Acid Binding Protein”, FABP-4 y Caveolina-1). Se han descrito procesos celulares que ponen en evidencia la interacción entre los lípidos y el endotelio, como la trancitosis y la formación de micro-dominios lipídicos, algo que no se ha puesto a prueba utilizando AP ni mucho menos en asociación a otros componentes circulantes presentes en el SM (34,35). En términos funcionales, está descrito que el AP por sí solo es capaz de inducir estrés oxidativo (36) en concentraciones fisiológicas (menos de 0,3 mM) pero no tiene efecto inflamatorio ni apoptótico (37), pero a concentraciones fisiopatológicas (sobre 0,5 mM) activa la vía NFκB (38), aumenta la expresión del inhibidor del activador

del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (39) y reduce la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (40).

En base a lo anterior, el uso del AP fue parte de nuestro estudio como el componente lipídico, en concentraciones previamente reportadas en un estudio de esteatosis hepática (41).

1.3.2 IL-6

La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria de fase crónica, identificada el año 1986, con efectos pleiotrópicos y estrechamente relacionada con el sistema inmune (42).

Es producida por múltiples tipos celulares entre los que se encuentra el adipocito, por lo que ha sido considerada una adipoquina (43). Ejerce su actividad biológica al unirse al receptor IL-6R/gp130, que se expresa en múltiples tipos celulares, entre los que se encuentra el endotelio (44). La activación de este sistema inicia la cascada de señalización JAK-STAT y MEK-ERK (45), las cuales pueden producir independientemente múltiples efectos relacionados con el daño endotelial, por medio de la activación de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), el aumento del estrés oxidativo y el aumento en la liberación del factor tisular (FT) (46). Por otra parte, se ha visto que la activación de estas cascadas de señalización induce la disminución de la fosforilación de eNOS, la inhibición de la liberación del FVW, la disminución de la biodisponibilidad de ON, la internalización dependiente de Caveolina-1 de LDL y lípidos y el aumento de la activación de la vía pro-inflamatoria NFκB (45). Actualmente, la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos ha aprobado la utilización clínica de anticuerpos neutralizantes y receptores solubles, con el fin de disminuir la actividad biológica de esta citoquina para el manejo de enfermedades autoinmunes (47). Estudios recientes, interesados en caracterizar al sujeto con SM, han dado evidencia de los niveles elevados de IL-6 presentes en esta condición crónica y más aún, su directa relación con los eventos cardiovasculares que presentan los sujetos de edad avanzada con SM (29, 48). A pesar de esto, no se ha reportado si la población chilena de sujetos con SM sigue la misma tendencia. A nuestro conocimiento, no hay reportes que evidencien niveles elevados de IL-6 en sujetos jóvenes con SM sin diabetes tipo 2 o HTA.

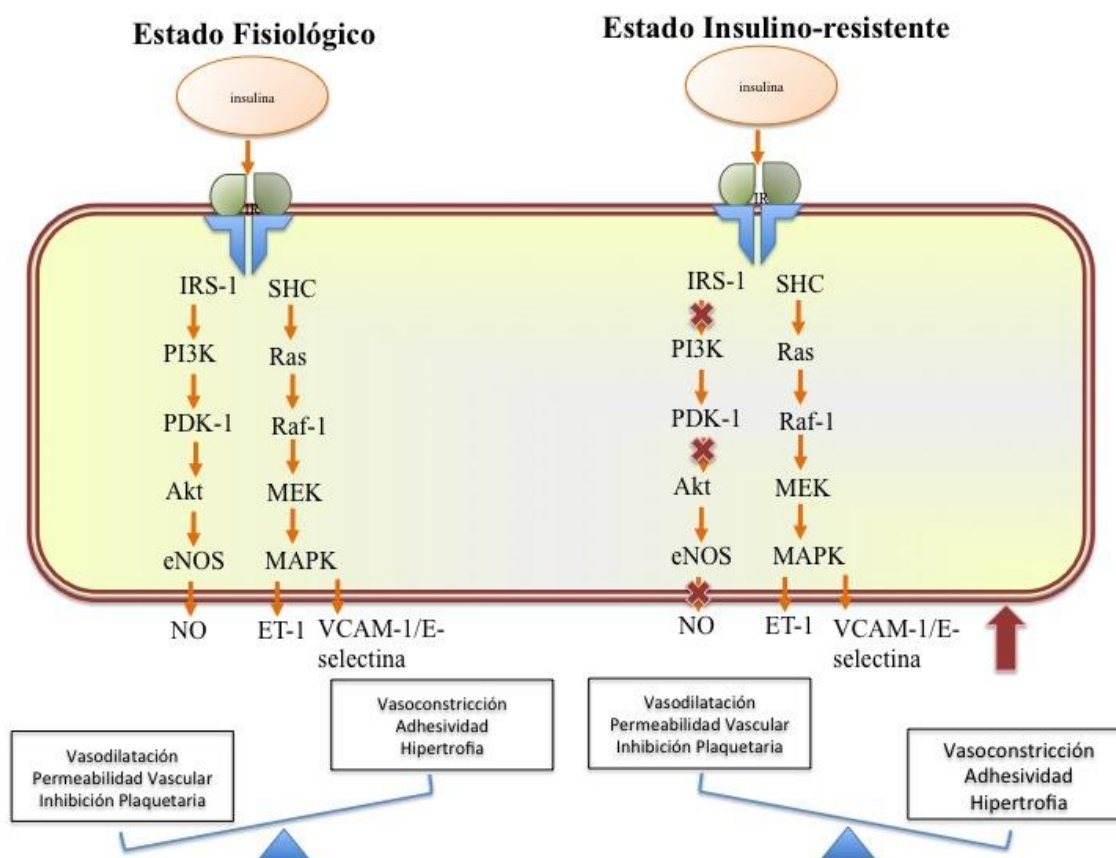
1.3.3 Insulina

La insulina es una hormona de 51 aminoácidos, que fue identificada y aislada en 1928, y que hoy se sabe que es secretada por las células β del páncreas. Su rol es mantener los niveles de glucosa plasmática por medio de la facilitación de su ingreso a la célula, regular el metabolismo de lípidos y proteínas y promover un efecto mitogénico a nivel celular (49). En relación al SM, se ha demostrado que en etapas tempranas de la diabetes (resistencia a la insulina o pre diabetes) se genera una hiperinsulinemia subclínica compensatoria capaz de mantener la glucosa preprandial en niveles normales (50,51).

El consumo de una dieta alta en grasas, en particular los ácidos grasos libres, disminuye la sensibilidad a la insulina y en estado crónico reduce la síntesis y secreción de esta hormona (52).

En células endoteliales en cultivo, está descrito que altas concentraciones de insulina (sobre 100nM) disminuyen la biodisponibilidad de ON y la fosforilación/activación de Akt, y aumentan los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), FVW, MMP9, ET, sCD40L y ET-1, emulando los efectos de la hiperinsulinemia compensatoria (53-58).

Fisiológicamente la insulina señala por medio de su receptor con acción dual preponderantemente hacia la vía PI3K/Akt en el adulto. En el caso de la resistencia a la insulina la señalización de esta vía disminuye mientras que se produce una sobre activación de la vía MAPK/ERK, lo que produce una baja de ON y una serie de alteraciones endoteliales hacia el fenotipo disfuncional (esquema 1, modificado de 59).



Esquema 1. Vías de señalización del receptor de insulina en estado fisiológico y patológico. IR: receptor de insulina, IRS-1: sustrato del receptor de insulina 1, PI3K: fosfoinositol 3 quinasa, PDK-1: piruvato deshidrogenasa lipoamida quinasa isoforma 1, Akt: proteína quinasa A, eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial, NO: óxido nítrico, SHC: Scr dominio contenido homólogo 2, Ras: sarcoma de rata, Raf-1: proto-oncogen serina/treonina proteína quinasa, MEK: quinasa de la MAPK, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos , ET-1: endotelina 1, VCAM-1: proteína adhesión celular vascular, E-Selectina: selectina endotelial)

1.4 Disfunción endotelial y aterogénesis

Las primeras aproximaciones clínicas, en base a observaciones funcionales, definieron la disfunción endotelial (DE) como la imposibilidad del vaso sanguíneo de aumentar su diámetro en respuesta a un estímulo conocido (acetilcolina), ocasionado por una generación insuficiente de agentes vasodilatadores en el endotelio (59,60). Actualmente, la DE es considerada como un desorden multifactorial que involucra alteraciones en la vaso relajación, pérdida de su propiedad anti inflamatoria, anti adhesiva y anti trombótica. A nivel molecular esto involucra, una biodisponibilidad de ON reducida, un aumento de estrés

oxidativo, una reducción de factores de transcripción de enzimas anti-oxidantes como Nrf2 (61), la producción de citoquinas y quimioquinas (MCP-1, CD40L), la exposición y liberación de proteínas pro adhesivas (E-Selectina, FVW, siCAM-1), un incremento en la permeabilidad celular, dada por alteraciones en la arquitectura celular (VE-caderina, Actina, MMPs) y una activación en vías de señalización, tales como la RhoA/ROCK. Estos fenómenos, de manera individual o en asociación, forman parte de la DE (50,62).

La consecuencia asociada a la DE, en la que confluyen las patologías relacionadas, es la aterogénesis, en la que el endotelio se encuentra en un desbalance pro-coagulante, pro-adhesivo, altamente permeable, pro-inflamatorio y vaso-constrictor, escenario propicio para el desarrollo de la placa pro-aterogénica (63,64).

En la última década se ha propuesto la interacción entre los lípidos y el endotelio, específicamente la posible internalización de colesterol y ácidos grasos a la célula endotelial, como parte del fenotipo pro-aterogénico (65).

Más recientemente, estudios *in-vivo* e *in-vitro* han entregado evidencias solidas que la activación de RhoA/ROCK desempeña un papel importante en los mecanismos patogénicos que subyacen a la DE y aterogenesis (66). Aunque en el nivel celular, la relación entre la activación de RhoA / ROCK y la DE está bien establecida, los datos relativos síndrome metabólico en los seres humanos es limitada (67, 68).

1.5 RhoA/ROCK como eje de señalización central en la disfunción endotelial

RhoA es una pequeña GTPasa que ha sido extensamente estudiada en los últimos 15 años. Sus funciones, a nivel celular, han sido ampliamente caracterizadas, en particular la capacidad de regular la adhesión, migración, contracción y proliferación celular, procesos dependientes de actina (69). Su blanco río abajo es ROCK, una serina/treonina quinasa que fue identificada en 1995, como la primera proteína blanco de RhoA en su cascada de señalización (70). En mamíferos se han identificado dos isoformas de esta quinasa, que se expresan constitutivamente en las células endoteliales vasculares: ROCK1 (ROK β o p160ROCK) y ROCK2 (ROK α o Rho-quinasa). No se han estudiado en detalle los procesos de regulación, entre ambas isoformas, pero por su nivel de homología (92% en el dominio quinasa), es ampliamente aceptado que la expresión de una es compensada por la otra y que se encuentran interrelacionadas (71).

Esta vía de señalización interacciona con las vías ERK, Akt y SRC, generando múltiples alteraciones en la fisiología celular, destacando la remodelación del citoesqueleto y la pérdida de integridad de la monocapa celular (71). A su vez, la activación de RhoA/ROCK produce una inhibición de la fosfatasa de la cadena liviana de miosina (MLC) produciendo un aumento en la fosforilación de la proteína blanco de la fosfatasa de la miosina (MYPT), por lo que resulta de gran utilidad este proceso para la medición de la actividad de RhoA/ROCK (72). Este eje de señalización está involucrado en múltiples cambios que sufre el endotelio hacia una disfunción: aumento de la permeabilidad, contracción, motilidad, polaridad y morfología celular (73).

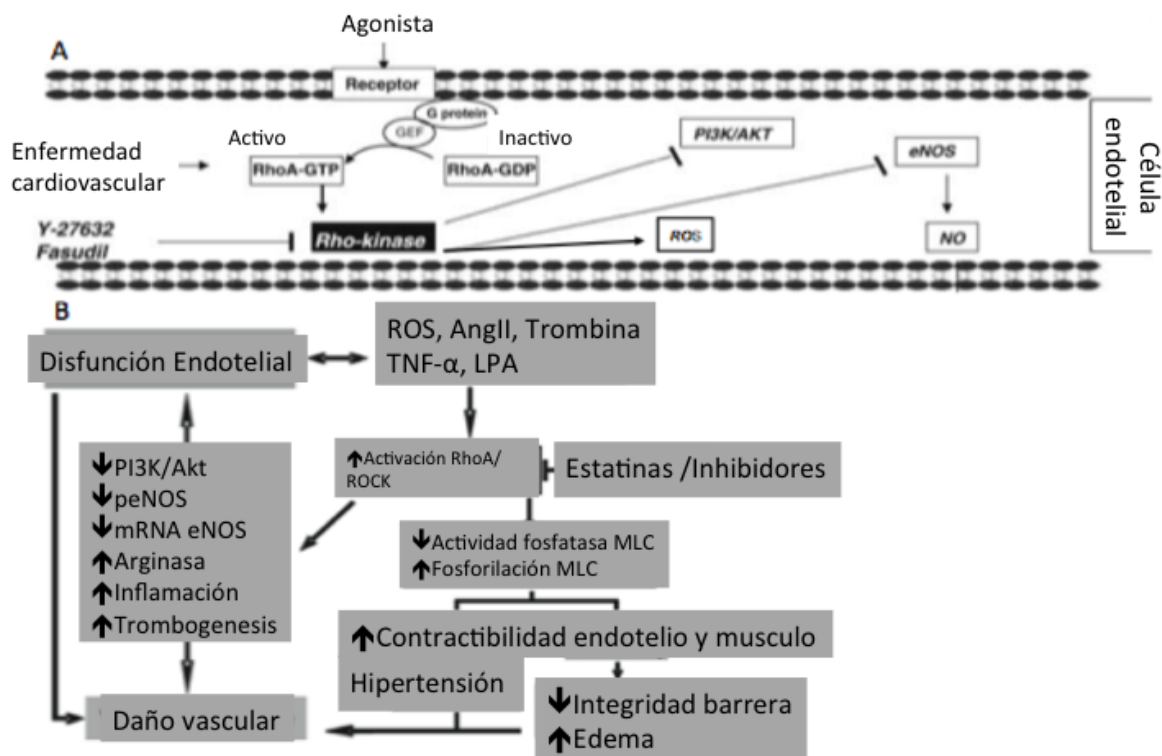
En relación a los mecanismos por los que RhoA/ROCK podría producir daño endotelial, la evidencia muestra que la eNOS es regulada negativamente por RhoA/ROCK a nivel de expresión (vida media del mRNA), de la fosforilación directa de la enzima en la serina 1177 y de la inactivación de la vía PI3K/Akt en asociación con la fosfatasa PTEN (esquema 2A) (modificado de 66, 71).

La sobre activación de la vía RhoA/ROCK se ha asociado con múltiples patologías, tales como la diabetes, la HTA y la aterosclerosis (74).

En modelos experimentales de diabetes se ha observado una correlación positiva entre la vía RhoA/ROCK y los niveles de ROS. Se han propuesto ciertos mecanismos indirectos, tales como la sobre activación de la arginasa por medio de la señalización RhoA/ROCK que produce una disminución en los niveles de L-arginina, un desacoplamiento de eNOS y la producción de ROS (figura 2B) (75).

En el laboratorio de Hemostasia y Trombosis, el grupo del Dr. Pereira y Dra. Sáez han estudiado la señalización de RhoA/ROCK en relación a enfermedades crónicas asociadas a aterosclerosis acelerada y mayor riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares tales como el consumo crónico de cocaína (76). Esto también ha sido estudiado por Jalil y colaboradores, utilizando la activación del eje Renina-Angiotensina como efector del daño cardiovascular (77).

Adicionalmente, y relacionado con disfunción endotelial, la sobre activación de RhoA/ROCK se relaciona con la inflamación y trombogénesis, mediada por el daño endotelial (esquema 2B) (modificado de 66,71).



Esquema 2. A) Vía de señalización de RhoA/ROCK en el endotelio y su efecto sobre la producción de NO y ROS. B) Modelo de los efectos cardiovasculares de la sobre activación de RhoA/ROCK y los componentes que inducen DE.

1.6 Asociación entre RhoA/ROCK, DE y SM

Los estudios actuales que asocian ciertas características del SM y la vía RhoA/ROCK en el contexto cardiovascular, se han centrado en el modelo de rata transgénica obesa (Zucker), la infusión del inhibidor de la vía RhoA/ROCK (Fasudil) y la cuantificación de parámetros fisiológicos como la presión arterial y la respuesta vaso-constrictora a un estímulo determinado (78, 79), todos estos estudios han utilizado modelos donde las patologías tales como la diabetes tipo 2, la obesidad y la hipertensión ya son clínicamente establecidas, considerando un ventana temporal tardía.

Existen pocos estudios que relacionen la activación de RhoA/ROCK y el SM. Liu y colaboradores (80) describieron la sobre activación de RhoA/ROCK en sujetos con SM de edades avanzadas con patologías asociadas tales como diabetes e HTA, por otra parte,

Schinzari y colaboradores (81) demostraron que la administración de Fasudil a sujetos con SM por sobre 50 años, mejora la respuesta vasodilatadora frente a una hiperinsulinemia local inducida. Sin embargo, estudios que relacionen la activación de RhoA/ROCK con marcadores de daño endotelial en sujetos jóvenes con SM en desarrollo, no se han reportado aún.

1.6 Intervenciones terapéuticas en SM

En clínica existen múltiples intervenciones terapéuticas para aminorar el daño causado por el SM, algunas de ellas son la reducción de peso, el cambio en los hábitos de alimentación, y el control de la glicemia entre otros. En conjunto, estas estrategias, evitarían la progresión de la patología pero no sería suficiente para revertir el deterioro vascular (82).

En términos farmacológicos, las medidas se han centrado en reducir el colesterol lo que a su vez aumenta los niveles de ON por su capacidad de prolongar la vida media del mRNA para eNOS (83), lo que no ha sido probado en el SM.

En la última década se ha estudiado la vía RhoA/ROCK como blanco terapéutico para evitar los efectos nocivos de su activación. Dos estudios clínicos recientes, en sujetos adultos mayores con enfermedad coronaria, han demostrado que Fasudil mejora la vasodilatación, esto apoyado con su capacidad de aumentar la biodisponibilidad de ON y de disminuir los lípidos plasmáticos (84-87).

1.7 Formulación del problema

Nuestro estudio está enfocado en el grupo de adultos jóvenes que consulta por sobrepeso y que es diagnosticado con SM por presentar además, aumento de la circunferencia abdominal y alteraciones en el perfil lipídico en un análisis de rutina, pero que no presenta síntomas clínicos de enfermedades asociadas como diabetes tipo 2 e HTA. Posterior a la caracterización de los sujetos evaluamos, en un modelo *in-vitro* de HUVEC, la participación de tres moléculas que se encuentran elevadas en estos sujetos, como inductoras de daño endotelial mediado por la activación de RhoA/ROCK. En un modelo animal de rata alimentada con dieta alta en grasa rica en AP, evaluamos la participación de RhoA/ROCK en el desarrollo del SM y en particular la presencia de los marcadores de DE.

Consideramos que los resultados de esta tesis entregan evidencias sobre la participación de RhoA/ROCK en las alteraciones relacionadas a la DE asociadas a SM y demuestran el rol del AP, IL-6 e insulina como componentes que, al estar elevados en pacientes con SM, promueven DE.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

IL-6, insulina, AP son moléculas que se encuentran elevadas en sujetos con SM sin diabetes tipo 2 o hipertensión arterial, e inducen DE mediada por la activación de RhoA/ROCK.

Objetivo general

Determinar en sujetos con SM, la presencia de niveles elevados de IL-6, insulina y AP, la activación de RhoA/ROCK y la presencia de marcadores de disfunción endotelial y evaluar el rol de la activación de RhoA/ROCK como mecanismo asociado al daño endotelial inducido por estos componentes.

Con el fin de abordar el objetivo, se puso a prueba la hipótesis en 3 modelos experimentales:

Ex-vivo (estudio en sujetos con SM): evaluar moléculas elevadas en sujetos jóvenes con SM y sobre activación de RhoA/ROCK

In-vitro (cultivo celular): estudiar la participación de RhoA/ROCK en el daño endotelial inducido por tres moléculas que se encuentran elevadas en sujetos con SM y que se relacionan con el estado glucídico, lipídico e inflamatorio (insulina, AP e IL-6, respectivamente).

In-vivo (modelo de SM inducido por dieta rica en AP): corroborar nuestras observaciones de la participación de la vía RhoA/ROCK en el SM, en un modelo animal con intervención farmacológica.

Objetivos específicos

Objetivo específico 1

Evaluar en sujetos jóvenes con SM la presencia de parámetros bioquímicos y marcadores que den cuenta de un daño endotelial hacia un fenotipo pro-aterosclerótico.

Objetivo específico 2

Evaluar el efecto de la combinación de AP, IL-6, e insulina en las células endoteliales in-vitro.

Objetivo específico 3

Evaluar en un modelo animal de SM inducido por una dieta alta en grasas y rica en AP, la participación de RhoA/ROCK en la progresión del cuadro patológico y la presencia de marcadores de DE.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sujetos de estudio y diseño experimental del objetivo 1

Se reclutaron 32 sujetos, sexo masculino, entre 21-41 años, en un estudio caso-control que, de acuerdo al examen médico, se diagnosticaron con SM por cumplir los siguientes tres parámetros de la guía ATPIII (2): (a) circunferencia de cintura ≥ 102 cm, (b) hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dl, (c) bajos niveles de HDL < 40 mg/dl. En forma paralela, se reclutaron sujetos controles pareados en edad y sexo, sin características SM. Los parámetros de exclusión del estudio incluyeron, síntomas o historial clínico de condiciones relacionadas a DE tales como apnea del sueño, cáncer, retinopatías, enfermedad renal crónica o enfermedades neuro-degenerativas. Adicionalmente, ninguno de los sujetos con SM o controles se encontraban tomando estatinas, aspirina o anti inflamatorios al momento del estudio; además se consideró como criterio de exclusión cualquier tratamiento farmacológico o dietas suplementadas con vitaminas. El tabaquismo fue equivalente entre sujetos SM y controles (40%) Todos los participantes reportaron nivel educacional universitario y firmaron un consentimiento informado incluido en el protocolo del estudio, aprobado por el comité de ética de la Universidad Católica de Chile (#13-190, 16/01/14).

La circunferencia de cintura se midió en el punto más angosto entre las crestas iliacas y el punto más bajo en la caja torácica en el punto de espiración normal. Se consideró ≥ 120 cm e IMC ≥ 40 como valores límites para el estudio. Las presiones sistólica y diastólica fueron medidas en los sujetos sentados, utilizando un esfigmomanómetro de mercurio. Los sonidos fase I y V de Korotkoff fueron usados para este propósito.

Para este estudio y de acuerdo a las guías ATPIII, se estableció como hipertensión una presión sistólica ≥ 140 mm Hg, presión diastólica ≥ 90 mm Hg, y/o tratamiento anti hipertensivo en curso. Al momento de ingresar, los sujetos con SM no estaban con tratamiento alguno.

3.1.1 Determinaciones de Laboratorio

En los sujetos voluntarios, la sangre venosa se colectó por punción no traumática antecubital en tubos recubiertos con ACD-A (anticoagulante Acido-citrato-dextrosa) (1:10, vol/vol). Todos los individuos reclutados estuvieron en ayuna por 12h antes de la colección de la muestra. El plasma libre de plaquetas (PFP del inglés *platelet free plasma*) se obtuvo

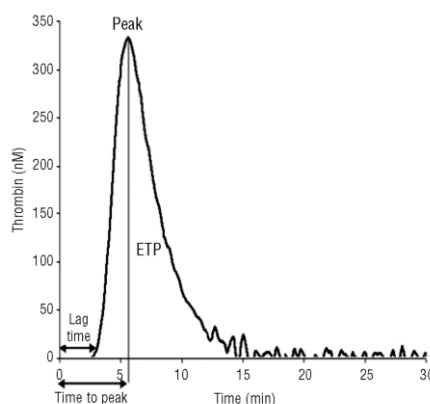
tomando los dos tercios superiores del plasma rico en plaquetas, luego se centrifugó a 150g por 10 minutos seguido de una segunda centrifugación a 14.000g por 8 minutos.

El suero de los voluntarios humanos se obtuvo en tubos sin anticoagulante, el que se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente seguido por una centrifugación a 3000rpm por 5 minutos. Los perfiles bioquímicos y lipídicos, la insulinemia y el hemograma se midieron en el Laboratorio Clínico Central de la Red Salud UC Christus.

En plasma se realizaron mediciones de generación de trombina (descrito en 3.1.2), ON (descrito en 3.5), marcadores de estrés oxidativo (descrito en 3.6), citoquinas y marcadores de DE (descrito en 3.7). En suero se realizaron mediciones de MMPS (descrito en 3.8) y FAME (descrito en 3.1.4).

3.1.2 Generación de trombina

La generación de trombina fue medida en PFP siguiendo el protocolo previamente descrito (88). Ochenta microlitros de PFP se mezcló con 20 μ L de PPP-Reagent 5pM Factor Tisular (Thrombinoscope bv, Maastricht, Holanda) en duplicado y luego se incubó con 20 μ L de FluCA-kit fluo-sustrato (Thrombinoscope bv, Maastricht, Holanda) en una proporción 1/200 v/v en buffer de generación de trombina (200mM HEPES, 140mM NaCl, 100mM CaCl₂ pH=7,35). El software Synapse BV (Thrombinoscope bv, Maastricht, Holanda) integró la curva e interpoló los datos desde una curva de calibración de trombina. Se midieron los parámetros estándares de un trombinograma (esquema 3).



Esquema 3. Curva estándar de generación de trombina mostrando los parámetros principales de medición

3.1.3 Determinación de la actividad de RhoA/ROCK en leucocitos

En un tubo cónico de 50mL se depositaron 10 mL de sangre extraída en tubos con EDTA, sobre 10 mL de histopaque 1077 (Sigma 10771, St. Louis, Missouri). Se centrifugó a 400g por 20 minutos a 25°C. Se separó la fracción de células mononucleares, identificada como un anillo blanquecino ubicado en el tercio superior del centrifugado. Este se traspasó a un tubo de 15 mL el cual se completó con PBS hasta 14mL. Se centrifugó a 900g por 10 minutos a 25° y el precipitado se resuspendió en 1mL de PBS el cual se traspasó a un tubo de 1,6 mL. De esta suspensión, 10µL se pusieron en cámara de Neubauer y se contó el número de células que contenía. La otra fracción se centrifugó a 900g por 5 minutos a 25°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 400µL de solución de lisis RIPA (Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, NP-40 1%). Se incubó por 15 minutos en hielo y luego se centrifugó a 10.000g por 15 minutos y 4°C, se recuperó el sobrenadante correspondiente a las proteínas solubilizadas de los leucocitos y el precipitado se descartó. Este sobrenadante incubó en RIPA con inhibidores de proteasas (1 mg/mL ácido aminocaproico, 1 mg/mL benzamidina, 0,2 mg/mL SBTI y 3 mmol/L PMSF) e inhibidores de fosfatasa (0,012 mg/mL ortovanadato de sodio 4.46 mg/mL pirofosfato de sodio y 4.2 mg/mL fluoruro de sodio). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford #500-0006 siguiendo el procedimiento establecido por el proveedor (BIO-RAD, California, USA). Luego, 30 µg de proteínas de lisados se separaron por electroforesis en gel al 10% SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por un western blot para la evaluación densitométrica de p-MYPT y MYPT (descrito en 3.4).

3.1.4 Perfil *Fatty Acids Methyl Esters* (FAME)

La composición de ácidos grasos en suero de 6 sujetos con SM, seleccionados al azar y sus controles, se determinó por cromatografía de gas GC 6000 Vega Serie 2 (Carlo Erba Instruments, Wigan, Manchester). Se utilizaron los estándares de un ensayo comercial (Nu-Chek Perp Inc, Elysian, Minnesota). Los resultados se expresaron en porcentaje de metil-esteres en relación al total de ácidos grasos encontrados en la muestra. El análisis FAME fue realizado por el laboratorio de Nutrición Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica, Santiago, Chile.

3.2 Preparación de HUVEC y diseño experimental del objetivo 2

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se obtuvieron desde cordones umbilicales de madres y neonatos sanos por digestión con colagenasa tipo II, siguiendo el conducto regular del comité Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, asociado a la certificación otorgada al proyecto Fondecyt 1141051. Las células se crecieron sobre placas cubiertas de gelatina con medio de cultivo base M199 que contiene 10% de suero fetal de bovino (SFB) y factores crecimiento de célula endotelial (Promocell), Gentamicina 0,003% y Penicilina/Estreptomicina 0,01%, a 37°C, 5% CO₂. Las células se dividieron hasta pasaje 2 o 4 en que se realizaron los estudios. Las células cultivadas se trataron con niveles elevados de insulina 100nM (54) (Calbiochem, disuelta en PBS 1X estéril) IL-6 4pg/mL (29) (Sigma, Sto. Louis, Missouri, disuelta en medio base) y/o AP 0,5mM (41) (Sigma, Sto. Louis, Missouri) en base a la revisión bibliográfica relacionada al SM o con la solución vehículo (solución 8% Ethanol y 5% BSA) por 2h, 5h, 8h y 24h en un medio con 2% SFB. Se realizaron experimentos en paralelo en presencia del inhibidor de la vía RhoA/ROCK Y-27632 10 µM (Sigma, Sto. Louis, Missouri). Luego de la incubación se colectó el sobrenadante del cultivo celular y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min para análisis posteriores.

El lisados celulares se evaluó la activación de RhoA/ROCK, Akt y ERK por western blot (descrito en 3.4), la actividad de MMPs (descrito en 3.8), los niveles de Nrf2, E-selectina (descrito en 3.4), la actividad pro-coagulante (descrito en 3.2.3) y los triglicéridos intracelulares (descritos en 3.9).

En el sobrenadante de las células previo (pre) y posterior (post) al estímulo, se midió ON (descrito en 3.5), ROS (descrito en 3.6), MMPs (descrito en 3.8), marcadores de DE e inflamación (descrito en 3.7). El valor final es la sustracción entre el valor obtenido en el sobrenadante post menos pre.

3.2.1 Inmunofluorescencia y tinciones en células

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con un cubre objetos de vidrio de 12mm de diámetro por pocillo, y se dejaron crecer hasta obtener sobre un 90% de confluencia. Posteriormente se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 8,3 mM,

KH₂PO₄ 1,5 mM) y se fijaron con paraformaldehído 3,4% por 5 min. Se volvieron a lavar con PBS, 3 veces por 2 minutos, y se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 0,05% por 1 min. Luego se bloqueó con BSA 10%, NGS (Normal Goat Serum) 1% y Gelatina 1% por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario anti VE-caderina (Cayman Chemical, Michigan USA, 1:50 en solución de bloqueo), anti FVW (Dako, Agilent technologies, Carpinteria, California, USA 1:250 en solución de bloqueo), SZ2 (1:250 en solución de bloqueo) o se realizaron las tinciones de Faloidina-Rodamina (1:500 en solución de bloqueo por 2 horas), LipidTox (0,05mg/mL en PBS por 10 minutos), o Filipina (0,05mg/mL por 30 minutos). Para las inmuno-fluorescencias se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C y se volvió a lavar 3 veces con PBS. Después se incubó con anticuerpo secundario, conjugado con sonda fluorescente por 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad. Se lavó con PBS, se montó en medio de montaje (Dako, Agilent technologies, Carpinteria, California, USA) y se mantuvo a 4°C hasta ser analizado en un microscopio de fluorescencia. La tinción Sudan IV se realizó en el laboratorio de Anatomía Patológica de la red Salud Christus UC siguiendo el procedimiento descrito en 3.3.1.

3.2.2 Citometría de flujo

Se trataron las células por 24h con las diferentes condiciones, luego se despegaron con tripsina concentración 2,5gr/L, se centrifugaron a 3000rpm por 5 minutos. Las células se resuspendieron en 400µL de PBS y se separaron en alícuotas de 100 µL. Dos alícuotas se incubaron por separado con isotipo Phycoerythrin (PE) o anticuerpo anti CD146 conjugado con el fluorocromo PE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) por 25 minutos a temperatura ambiente. Luego las alícuotas se lavaron con PBS por medio de centrifugación. Finalmente se re-suspendieron en 250µL de PBS y el número de eventos se leyó con el equipo ACCURI C6 *Flow Cytometer* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey).

3.2.3 Actividad pro-coagulante en lisados celulares

La actividad de FT se midió por activación enzimática de Factor X (FX) y la lectura usando un sustrato cromogénico. Brevemente, se cargaron 70µL de lisado celular obtenido en b-octil con 20µL de FX (1,2 UI/mL) (HYPTHEM BioMED, Neuville-sur-Oise, France), 20µL

de FVIIa (1,2 UI/mL) (American Diagnostica, Lexington, Massachusetts) 20 μ L de CaCl₂ (25mM) y 40 μ L de sustrato cromogénico BIOPHEN CS-11 (Aniara, West Chester, Ohio) en una placa de ELISA. Posteriormente se incubó a 37°C y se midió cada 30 minutos a una absorbancia de 405nm en el equipo Multiskan FC microplate photometer (Thermo Fisher Sci., Waltham, Massachusetts). La cantidad de FXa generado se obtuvo interpolando los valores a partir de una curva estandar realizada con FXa a concentraciones conocidas: 17, 85, 170, 850, 1700, 8500, 17000 pmol/mL. Los valores fueron normalizados por μ g de proteína cuantificado en el lisado por Bradford.

3.2.4 Adhesión plaquetaria a la superficie de HUVEC en ensayo estático

3.2.4.1 Obtención de plaquetas lavadas

La extracción de plaquetas se realizó por punción en el antebrazo de sujetos sanos, y se recolectó sangre venosa en presencia de anticoagulante ACD (dextrosa 2,4% p/v y citrato de sodio 2,2% p/v) con prostaglandinas E1 (PGE-1, 1 μ M). Las muestras se centrifugaron a 200g por 9 min a 4°C, recuperándose la fase superior correspondiente al plasma rico en plaquetas (PRP). Esta fracción se volvió a centrifugar a 1.500g por 8 min a 4°C para obtener las plaquetas. El precipitado se re-suspendió en solución Tyrode de lavado (NaCl 137 mM, KCl 2mM, MgCl₂ 2mM, NaHCO₃ 12mM, Na₂HPO₄ 0,35mM, BSA 1%, glucosa 5,5 mM, PGE-1 56nM, pH 6,2) y se centrifugó 3 veces a 200g por 9 minutos (para remover los monocitos y eritrocitos contaminantes), recuperándose el sobrenadante en cada ocasión. Finalmente, se centrifugó a 1.500g por 9 min a 4°C y el precipitado se re-suspendió en solución Tyrode. El número de plaquetas se determinó en el equipo Culter Counter Z1. Se agregaron 10⁷ plaquetas por pocillo (placa de 24 pocillos) para la co-incubación con HUVEC.

3.2.4.2 Ensayo de adhesión

Las HUVEC se incubaron con los estímulos anteriormente mencionados y se co-incubaron con 1x10⁷ plaquetas por 20 minutos. Se extrajo el medio de cultivo y se lavó la preparación tres veces con PBS para eliminar las plaquetas no adheridas. Se fijaron las HUVEC con formaldehído (Merck, Whitehouse Station, New Jersey) al 3,7% v/v en PBS y se

permeabilizó con Tritón X-100 al 0,1% (Sigma-Aldrich, Sto. Louis, Missouri) (v/v en PBS 1X). La preparación se inmunotizó siguiendo el protocolo descrito en 3.2.1.

3.3 Modelo animal Síndrome Metabólico y diseño experimental del objetivo 3

Se obtuvieron 24 ratas macho Sprague-Dawley, de 4 semanas ($100 \pm 1,9$ gramos), desde el Bioterio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile y se mantuvieron en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas de Universidad Católica por 14 semanas. 12 ratas se alimentaron con la dieta comercial OpenSource D12492, alta en grasas (60% Kcal/grasas) y rica en ácido Palmítico (49,9g%) por 14 semanas, mientras que las otras 12 ratas recibieron una dieta control D12450J (10g% ácidos grasos). Durante las 2 últimas semanas de dieta se administró Fasudil 100mg/kg/día (diluido en suero, en un volumen final de 0,2 mL), vía oral, a un subgrupo de 6 ratas con dieta control y a otro de 6 ratas con dieta alta en grasas. Finalizado el experimento las ratas se sacrificaron bajo anestesia por sobredosis de Xilaxina/Ketamina, siguiendo los protocolos aprobados por la comisión de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de nuestra universidad (CBB-210/2013).

3.2.1 Medición de parámetros fisiológicos

Durante el período de tratamiento se midió semanalmente el peso y tasa de alimentación. Cada tres semanas se evaluó la presión por el sistema *CODA tail-cuff*, los triglicéridos (Cardiocheck) y la glucosa (Accucheck) utilizando una gota de sangre obtenida por punción de las venas de la cola. La ganancia de peso se definió como la sustracción entre el peso obtenido en la semana X_2 menos el peso de la semana anterior X_1 .

3.2.2 Mediciones en suero

Post sedación Xilaxina/Ketamina el animal se desangró por punción ventricular y el suero se obtuvo en tubos sin anticoagulante, el que se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente seguido por una centrifugación a 3.000rpm por 5 minutos. Los perfiles bioquímicos y lipídico, se midieron en el Laboratorio Clínico Central de la Red Salud UC Christus. En el suero de los animales se midió ON (descrito en 3.5), marcadores de estrés

oxidativo (descrito en 3.6), marcadores de inflamación y DE e insulina por ELISA (descrito en 3.7) y MMPs (descrito en 3.8).

3.2.3 Determinaciones en tejidos

Se colectó un segmento de la aorta, un fragmento de hígado, el corazón y los riñones.

Las aortas fueron lisadas en RIPA (Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, NP-40 1%) con inhibidores de proteasas (1 mg/mL ácido aminocaproico, 1 mg/mL benzamidina, 0,2 mg/mL SBTI y 3 mmol/L PMSF) e inhibidores de fosfatasa (0,012 mg/mL ortovanadato de sodio 4,46 mg/ml pirofosfato de sodio y 4,2 mg/mL fluoruro de sodio). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. 30 µg de proteínas de lisados se separaron por electroforesis en gel al 10% SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido por un western blot para la evaluación densitométrica de p-MYPT/ MYPT, p-Akt,/Akt, p-ERK/ERK, p-eNOS/eNOS, E-selectina/ERK (descrito en 3.4) y actividad de MMPs (descrito en 3.8). Adicionalmente se cuantifico, en lisados de aortas, el contenido de triglicéridos (descrito en 3.9).

Parte de los tejidos se congeló en nitrógeno y se mantuvo a -80°C para posterior análisis de proteínas y parte del tejido se fijó en solución de PFA 4% o solución de Bouin y se incluyó en parafina y se usó en estudios histológicos por cortes de 5 µm en micrótopo. Otra parte del tejido se incluyó directamente en OCT sin fijación y se usó en estudios histológicos por cortes en criostato de 4 micras.

3.3.1 Histoquímica en aortas y corazón

Los tejidos se fijaron en PFA al 4%, se incluyeron en parafina y posteriormente se realizaron cortes de 5 micras con micrótopo. Otro segmento del tejido se fijó en OCT y guardó a -80° para posteriores cortes a 4 micras en criostato. Las tinciones Hematoxilina-Eosina, Sudan IV, Lipid Oil Red, Von Gieson, PAS y las inmuno-histoquímicas para macrófagos y mieloperoxidasa, las realizó el laboratorio de Anatomía Patológica de la Red Salud UC Christus, siguiendo los protocolos internos (89).

3.4 Electroforesis y Análisis por Western Blot

Se determinaron los niveles relativos de p-MYPT (Cyclex, Woburn, Massachusetts), MYPT (BD Transduction Laboratories, Becton, Dickinson and Co, Franklin Lakes, New Jersey), p-Akt (Cell Signal Technology, Danvers, Massachusetts), Akt (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), ERK (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas), p-eNOS (BD Transduction Laboratories, Becton, Dickinson and Co, Franklin Lakes, New Jersey), eNOS (BD Transduction Laboratories, Becton, Dickinson and Co, Franklin Lakes, New Jersey), E-Selectin (Ancell, Bayport, MN) y Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tezas) utilizando los anticuerpos anteriormente mencionados. Las células endoteliales, los homogenizados de aortas o los leucocitos se lisaron en RIPA (Tris-HCl 20mM, NaCl 150mM, Na₂EDTA 1mM, EGTA 1mM, NP-40 1%) con inhibidores de proteasas (1 mg/mL ácido aminocaproico, 1 mg/mL benzamidina, 0,2 mg/mL SBTI y 3 mmol/L PMSF) e inhibidores de fosfatasa (0,012 mg/mL ortovanadato de sodio 4,46 mg/mL pirofosfato de sodio y 4,2 mg/mL fluoruro de sodio). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. 30 µg de proteínas de lisados se separaron por electroforesis en gel al 10% SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) por 2h a 60V. Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF de poro 0,45 µm, la que posteriormente se bloqueó con 5% leche descremada, 1% BSA en PBS con 0,05% Tween 20 a temperatura ambiente por 4h. Luego, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo primario diluido en PBS-Tween 20 y 1% BSA (1:500), seguido por 4 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con PBS-Tween 20. Luego las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en PBS-Tween 20 y 1% BSA (1:1.000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) por 1h a temperatura ambiente. La inmuno-reactividad de las bandas se visualizó utilizando un reactivo quimio-luminiscente (Western Lightning, Perkin Elmer) siguiendo el procedimiento descrito por el proveedor y la detección se obtuvo con el equipo Chemidoc-IT Imaging System (UVP LLC, Upland, California). Cada membrana se cuantificó por densitometría con el programa ScionImage (NIH, Bethesda, Maryland).

3.5 Medición de Óxido Nítrico

La concentración de nitratos, como indicador de la producción de ON se midió en plasma humano desproteinizado, medio de cultivo de células y suero desproteinizado de ratas, por la reacción de Griess siguiendo el protocolo estándar del ensayo comercial Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit #780001 (Cayman Chemical, Michigan USA). Brevemente, 100µL de la muestra se mezclaron con 15µL de reactivo Griess (0,1% dihidrocloruro de naftilenediamina en agua destilada, 1% sulfanilamida y 5% ácido ortofosfórico concentrado) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. La concentración de nitritos se determinó midiendo la absorbancia con el lector Epoc Microplate e interpolando los valores en base a una curva estándar de nitrato de plata.

La previa deproteinización de plasmas y sueros se realizó con unidades de ultra filtrado Amicon Pro (Merck Millipore) 30000 NMWL.

3.6 Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo

Los niveles de Sustancias Reactivas de ácido Tiobarbitúrico (TBARS) se estimaron en plasma, extracto celular (sobrenadante más lisado) o suero. Brevemente, 100 µL de la muestra fue mezclado con 50 µL de SDS (8% w/v), 375 µL de ácido tiobarbitúrico (0.8% w/v), 375 µL ácido acético (20%v/v) y calentado por 60 min a 90°C. El material precipitado se removió por centrifugación a 10.000 rpm por 45 minutos y la absorbancia del sobrenadante se determinó a 532nm. Los niveles de TBARS se calcularon usando una curva de calibración con malondialdehído (MDA).

La Oxidación Avanzada de productos proteicos (AOPP) se midió en plasma de voluntarios humanos, suero de ratas o extractos celulares. Para esto, 40µL de cada uno de ellos se diluyo con 150µL de PBS y se incubó con 20µL de ácido acético glaciar por 15 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de la reacción colorimétrica con el yoduro de potasio se realizó espectrofotométricamente a 340nm. Los valores se interpolaron en una curva de calibrado con Cloramina-T.

En células, la producción de ROS se midió por DCF. HUVEC sembradas en placas de 96 pocillos se incubaron con DCF 10µM por 30min a 37°C en solución de Earl (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,9 mM MgCl₂, 25 mM HEPES, pH 7,4). Luego las células se lavaron dos veces con PBS tibio y se estimularon con IL-6, AP e insulina. La placa se instaló inmediatamente en un fluorímetro con una longitud de onda de excitación

485 y una de emisión de 520nm y se midió su fluorescencia por 500 minutos. Se utilizó la respuesta a la estimulación con PMA como control positivo del ensayo.

3.7 Medición de marcadores inflamatorios y de disfunción endotelial

Los marcadores de inflamación y de DE se midieron en el PFP humano, el medio de cultivo de las células y el suero de animales por ELISA: hsPCR, IL-6, TNF- α , TGF- β , sICAM-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-8 (Bender Medsystems, San Diego, CA), MCP-1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y sCD40L (eBioscience, San Diego, CA). En el medio de cultivo de las células, se midió el nivel de ácido úrico por el método PAP (análisis enzimático colorimétrico para ácido úrico con factor aclarante de lípidos). Se siguió el protocolo establecido por el ensayo *Uric Acid Liquicolor* (Human Biochemica und Diagnostica, Wiesbaden, Germany).

3.8 Determinación de la actividad de MMP2 y MMP9

Las actividades de MMP 2 y 9 se determinaron por zimografía en sueros humanos, sobrenadantes y lisados celulares, sueros y aortas de ratas. Brevemente, 40 μ g de proteínas en solución de carga (2% SDS, 10% glicerol, 0.001% azul de bromofenol, 125 mM Tris-HCl; pH 6,8) se separaron por electroforesis SDS-PAGE al 8% co-polimerizado con gelatina al 2% como sustrato. Luego de la electroforesis los geles se incubaron en solución Tritón X-100 al 2% por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, los geles se lavaron dos veces con agua y se incubaron a 37°C con agitación suave por 24 horas en tampón Tris-HCl, pH 7,4, con 10 mM CaCl₂. Los geles se tiñeron con 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 y luego se destiñeron con solución metanol 30% v/v y ácido acético 10% v/v.

La actividad gelatinolítica fue detectada como bandas desteñidas frente al fondo azul en la gelatina. Las bandas se escanearon y midieron desitrométricamente utilizando ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La actividad de MMP2 y MMP9 se identificó por la presencia de bandas sin tinción azul a 72 y 92 kDa, respectivamente.

3.9 Medición de triglicéridos en modelo *in-vitro* e *in-vivo*

Se analizaron 50µL de extractos de células y de aortas, previamente lisados en RIPA en presencia de inhibidores, utilizando el ensayo enzimático colorimétrico *Triglyceride Quantification* de BioVision de acuerdo al protocolo especificado por el proveedor. Los valores de triglicéridos se midieron espectrofotométricamente a 570 nm y se interpolaron en una curva estándar de triglicéridos. Los valores se normalizaron por microgramo de proteínas presente en el lisado.

3.10 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con Prism version 6 (GraphPad software, La Jolla, California) y se representaron como media $\pm$ error estándar (EE). La normalidad se evaluó por el test Shapiro-Wilk. Las diferencias entre grupos para el estudio en sujetos voluntarios se analizaron utilizando el test de *t* paramétrico no pareado. Para los estudios *in-vitro* e *in-vivo*, las diferencias entre las medias de grupos se analizaron por ANOVA no paramétrica de una vía, *Kruskal-Wallis post hoc* test. La significancia estadística fue definida como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Objetivo 1

Los sujetos consultaron al médico por su preocupación relacionada a sobrepeso y aumento de circunferencia abdominal. Al momento de la consulta, no presentaban manifestación clínica de otras patologías. Sin embargo, fueron diagnosticados con SM en base a la guía de diagnóstico ATPIII (Metodología) por posterior hallazgo de laboratorio de dislipidemia (90).

Los resultados obtenidos en análisis clínicos y de laboratorio se muestran en la tabla 1. El grupo de sujetos jóvenes con SM presentó mayor circunferencia de cintura (CC), no-HDL-C, LDL-C, VLDL-C, y enzimas hepáticas, comparado con los sujetos control. A pesar que los sujetos con SM presentaron presión arterial (sistólica y diastólica) mayor a los controles, éstas no superaron los 140mmHg y 90 mmHg que se considera HTA (20). Interesantemente, los sujetos SM presentaron niveles plasmáticos de ácido úrico elevados dentro de los rangos normales y de creatinina disminuidos ($p < 0,05$) comparado a controles. Por otro lado, a pesar de no mostrar diferencias en los niveles de glucosa preprandial los sujetos con SM presentaron niveles elevados de HOMA-IR y de insulina en comparación a controles, aunque dentro de niveles de normalidad para este último.

Adicionalmente los sujetos con SM mostraron un mayor potencial endógeno de trombina (ETP) y *peak* de trombina en comparación a los controles. Otros parámetros como *Lag time* y *time to peak* no fueron significativamente diferentes entre los grupos (datos no mostrados).

Parámetros hemostáticos tales como recuento plaquetario y hemograma no mostraron diferencias significativas entre sujetos con SM y controles (tabla 1).

4.1.2 Marcadores de inflamación y estrés oxidativo

Como se muestra en la tabla 2, los sujetos con SM presentaron un incremento significativo, en comparación a los sujetos sanos, en los niveles de marcadores de estrés oxidativo (TBARS y AOPP) y de inflamación (hsPCR, IL-6 y sCD40L). Otras citoquinas tales como TNF- α y TGF- β no mostraron diferencias significativas entre sujetos SM y controles (tabla 2) y en ambos grupos de individuos la IL-8 no fue detectable.

Tabla 1. Características clínicas, bioquímicas y antropométricas de la población estudiada

	Controles (n=25)	SM (n=32)	p
Edad(años)	31,3±1,3	31,5±0,8	0,89
IMC (Kg/m ²)	23,7±0,4	33,6±1,2	<0,0001
CC (cm)	86,5±1,1	107,6±1,7	<0,0001
PS (mmHg)	121,6±2,1	137,5±2,7	<0,0001
PD (mmHg)	69,1±1,6	81,6±1,6	<0,0001
TG (mg/dL)	81,6±6,1	229,6±21,8	<0,0001
No-HDL-c	115,1±5,2	172,2±11,4	<0,0001
HDL-c (mg/dL)	55,8±3,1	39,1±1,1	<0,0001
LDL-c (mg/dL)	99,7±4,8	123,6±7,9	0,01
VLDL-c (mg/dL)	16±1,1	46,3±4,8	<0,0001
Glucosa (mg/dL)	80,6±3,1	86,16±1	0,09
Insulina (μUI/mL)	6,6±0,5	15,8±1,4	<0,0001
HOMA-IR	1,37±0,1	3,46±0,3	<0,0001
SGOT (U/L)	22,4±1,6	30,4±2,9	0,03
ALP (U/L)	69,2±4	86,1±4,7	0,01
Na (mmol/L)	147,2±0,3	146,8±0,4	0,53
K (mmol/L)	3,8±0,2	3,5±0,08	0,23
Creatinina (mg/dL)	0,8±0,07	0,6±0,06	0,04
ETP (nM de Trombina)	321,9±15,9	344,8±9,9	0,04
Peak de Trombina (nM)	69,5±4,3	74,4±2	0,08
Ácido úrico (mg/dL)	4,9±0,1	6,5±0,1	<0,0001
Recuento plaquetario (x10 ³)	234±7,8	255±9,1	0,09

Tabla 1. Abreviaciones: IMC, índice de masa corporal; CC, circunferencia de cintura; PA, presión sistólica; PD, presión diastólica. Los siguientes parámetros se midieron en plasma o en suero: TG, triglicéridos; No-HDL-c, colesterol no HDL, HDL-c, lipoproteínas de alta densidad; LDL-c, lipoproteínas de baja densidad; VLDL-c, lipoproteínas de muy baja densidad; HOMA-IR, homeostasis model assessment-insulin resistance; SGOT, aspartato transaminasa; ALP, fosfatasa alcalina; ETP, potencial endógeno de trombina. Todos los datos se expresan como la media ± EE. La significancia fue calculada en base al Test de *t*.

Tabla 2. Marcadores estrés oxidativo e inflamación

	Controles (n=25)	SM (n=32)	p
TBARS (μM)	13±2,5	20,5±2,9	0,05
AOPP (μmol/L)	187,1±14,7	297,7±35,2	0,01
hsPCR (ng/mL)	293,7±62,8	1475±137	<0,0001
IL-6 (pg/mL)	1,2±0,1	3,6±0,3	<0,0001
sCD40L (ng/mL)	1,7±1	2,3±0,14	0,0027
TNF-α (pg/mL)	8±0,7	8,3±1,6	0,86
TGF-β (pg/mL)	69±5,8	69,7±7,7	0,94

Tabla 2. Abreviaciones: hsPCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; TBARS, especies reactivas del ácido tiobarbitúrico; AOPP, productos proteicos de oxidación avanzada. Todos los datos están representados como media ± EE. La significancia fue calculada en base al Test de *t*.

4.1.3 Marcadores de disfunción endotelial

Los niveles de MCP-1 y siCAM-1 se encontraron significativamente elevados en sujetos con SM comparados con los controles. Por otro lado, el ON plasmático se encontró reducido en este grupo de sujetos en comparación a los controles sanos. Otros marcadores, posibles indicadores de daño endotelial, tales como FVW no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 3).

4.1.4 Actividad de RhoA/ROCK y MMPs en sujetos con SM y controles

Los sujetos jóvenes con SM presentaron niveles elevados en la actividad de RhoA/ROCK en leucocitos en comparación a sujetos sanos ($3,9 \pm 1$ versus $1,8 \pm 0,5$ unidades relativas OD; $p=0,0079$) (Figura 1A). Por otro lado, aunque los niveles de actividad de proMMP9 y MMP2 no fueron significativamente diferentes entre sujetos con SM y controles (27955 ± 4713 versus 21374 ± 3107 unidades relativas OD para proMMP9 y 56648 ± 3918 versus 51162 ± 3161 unidades relativas OD para MMP2), se observa una tendencia al aumento de la actividad de ambas enzimas ($p=0,08$) (Figura 1B).

4.1.5 Perfil de Ácidos Grasos

Como se muestra en la figura 2, se midieron los niveles de 32 ácidos grasos en el suero de 6 sujetos con SM y sus respectivos controles. Encontramos que el grupo de sujetos con SM, en comparación a los controles, presentó niveles elevados de AP ($22,6 \pm 1\%$ versus $17,1 \pm 0,9\%$, $p=0,002$), ácido mirístico ($0,9 \pm 0,16\%$ versus $0,3 \pm 0,13\%$, $p=0,02$) y ácido palmitoleico ($2 \pm 0,27\%$ versus $0,98 \pm 0,12\%$, $p=0,007$). Adicionalmente, entre el grupo de ácidos grasos insaturados, los sujetos con SM presentaron una disminución en los niveles de ácido araquidónico ($4,88 \pm 0,35\%$ versus $7,4 \pm 0,5\%$, $p=0,002$), y DHA ($1,1 \pm 0,05\%$ versus $1,7 \pm 0,2\%$, $p=0,01$) (Figura 2).

Tabla 3. Marcadores de disfunción endotelial

	Controles (n=25)	SM (n=32)	<i>p</i>
ON (mM)	16,1±2,2	8,8±0,6	0,0009
sICAM-1 (ng/mL)	156,7±5,3	208,8±7,5	<0,0001
MCP-1 (pg/mL)	69,1±6	131,8±8,8	<0,0001
VWF PUC (U/dL)	75,8±4,4	78,9±3,8	0,83
VWF antigénico (U/dL)	73,7±4,8	80,4±3,3	0,25

Tabla 3. Abreviaciones: ON, óxido nítrico; FVW PUC, Factor de Von Willebrand Prueba de Unión a Colágeno. Todos los datos se expresan como media ± EE. La significancia fue calculada en base al Test de *t*.

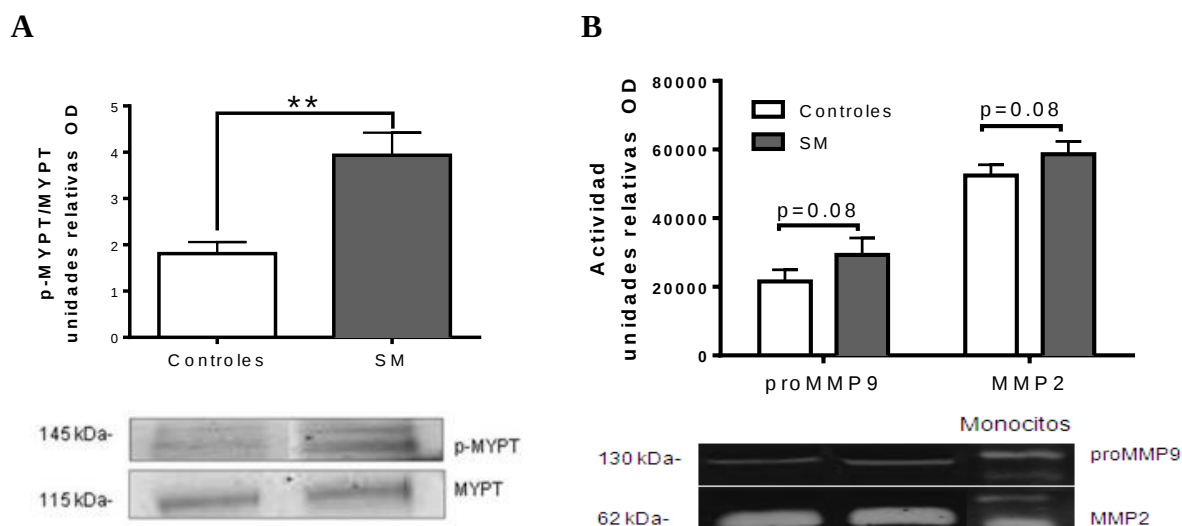


Figura 1. Activación de RhoA/ROCK en leucocitos y actividad de MMPs en suero de sujetos con SM

(A) Cuantificación de la relación entre p-MYPT y MYPT de un grupo representativo de sujetos con SM (n=5) y controles (n=5). Western blots representativos usando 70µg de lisados de leucocitos. (B) Gráfico obtenido en base a la cuantificación de la actividad de MMPs. Geles de zimografía representativos de sujetos con SM y sus controles. Se usaron 40µg de proteínas séricas. La tercera línea corresponde a 40µg de lisado de monocitos utilizado como control positivo y guía de peso molecular. n=12 por grupo. La significancia fue calculada en base al Test de *t*. **p<0,01.

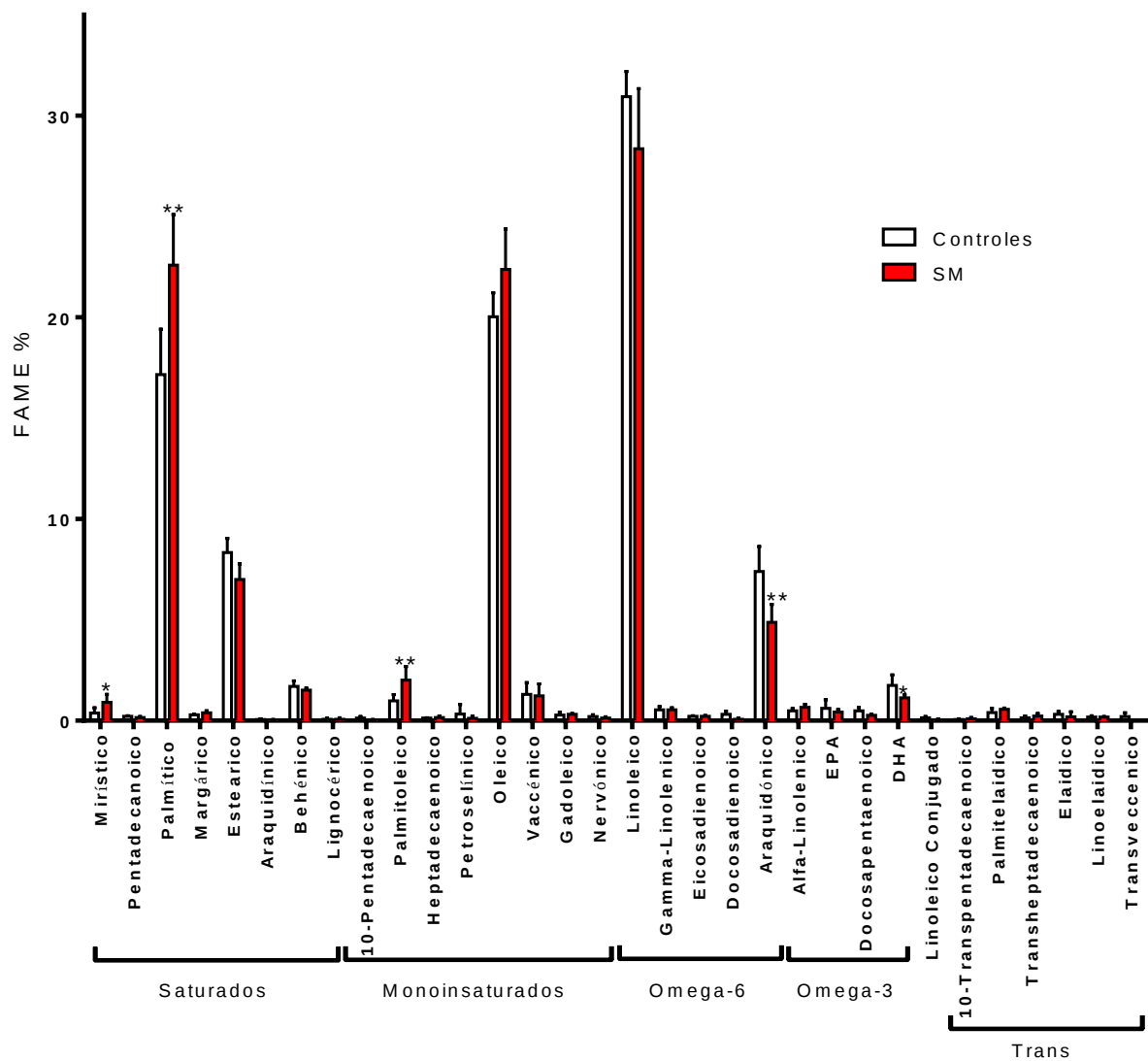


Figura 2. **Perfil de FAME**

Gráfico de barra de la composición sérica de FAME (del inglés fatty acid methyl ester) en porcentaje, en un grupo representativo de sujetos con SM (n=6) y sus respectivos controles (n=6). La significancia fue calculada en base al Test de *Mann Whitney* para cada compuesto * p<0,05, **p<0,001.

4.2 Objetivo 2

En el modelo *in-vitro* de células endoteliales, se evaluó el efecto de tres componentes que se encontraron elevados en sujetos con SM, a diferentes tiempos de estimulación. La estimulación con IL-6, AP e insulina en conjunto se denominó “triple”. Algunos de los estudios *in-vitro* se analizaron además con los componentes por si solos, los que se especifican cuando corresponda.

4.2.1 Actividad de RhoA/ROCK

Como se muestra en la figura 3, en células estimuladas con IL-6, AP e insulina en concentraciones semejantes a las encontradas en los sujetos diagnosticados con SM de nuestro estudio, para IL-6 (3,5 pg/mL) e insulina (5,8 μ UI/mL equivalentes a 94nM considerando que 1 UI corresponde a 0,548mg y que el peso molecular de la insulina es 5808 gr/mol), y en base a los reportes mencionados en la introducción para AP. Se observó un incremento en los niveles de la relación entre p-MYPT e MYPT durante todos los tiempos de incubación estudiados, comparado con las células control no tratadas, mostrando un aumento mayor a las 2h y 24h de tratamiento (Figura 3A). La co-incubación con el inhibidor de RhoA/ROCK, Y-27632, evitó el aumento de p-MYPT en los 4 tiempos de estimulación.

4.2.2 Activación de Akt y ERK

Los niveles de p-Akt aumentaron significativamente con la triple estimulación a las 2h, sin embargo se observó una disminución de la actividad en todos los tiempos posteriores (Figura 3B). La inhibición de RhoA/ROCK con Y-27632 evitó el aumento producido por la estimulación a las 2h llevando los niveles de p-Akt cercanos al control. Por otra parte, a tiempos más prolongados de estimulación (24h) la inhibición de RhoA/ROCK con Y-27632 no recuperó la actividad de Akt.

La fosforilación de ERK en HUVEC estimuladas con la triple sigue una tendencia similar a p-Akt: a las 2h está significativamente activada, retorna a valores controles a las 5h y luego decae bajo los niveles control a las 8h y 24h de estimulación (Figura 3C). Nuevamente, la co-incubación con Y-27632, restauró en un 95% los niveles de p-ERK respecto al control

en tiempos cortos pero no fue capaz de evitar la reducción producida por IL-6, AP e insulina a las 8h y 24h.

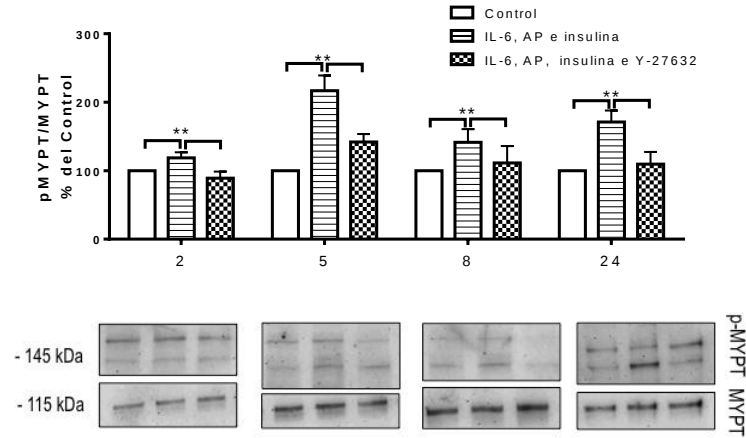
Los resultados obtenidos para la actividad de las tres enzimas podrían distinguir dos etapas generales de respuesta. Antes de las 5 primeras horas de estímulo se observa un aumento de la actividad de las tres enzimas, sin embargo, a tiempos más prolongados de estímulo, 8 y 24h, se observa que la actividad de RhoA/ROCK permanece aumentada mientras que la actividad de Akt y ERK está disminuida.

4.2.3 Niveles de Óxido Nítrico y actividad de eNOS

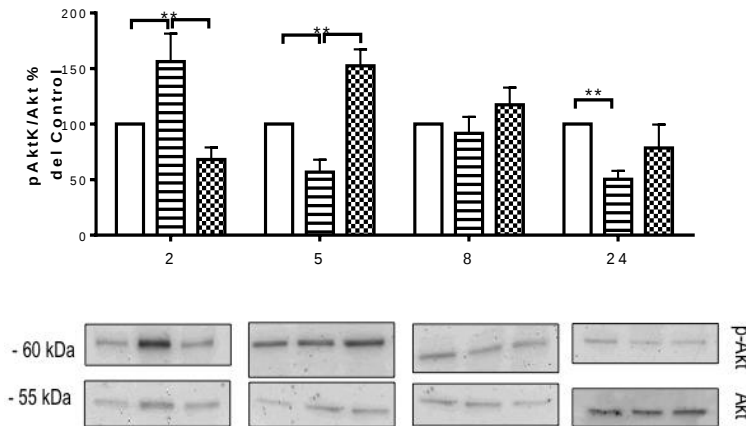
La definición clásica de DE se basa en la reducción de la biodisponibilidad de ON como producto del daño endotelial. Se evaluaron los niveles de ON, mediante la medición del metabolito final, nitrito, en sobrenadantes de HUVEC a diferentes tiempos de estimulación. No se encontraron diferencias en los niveles de ON en células estimuladas con IL-6, AP e insulina, en combinación y por sí solos (datos no mostrados), a 2h, 5h y 8h. Sin embargo, a las 24h, los componentes en estudio por sí solos y en conjunto, indujeron una reducción significativa del ON, la cual se impidió por la inhibición de RhoA/ROCK (Figura 4A).

Simultáneamente, se midió la actividad de eNOS, por medio de su fosforilación en la serina 1177, en los tiempos de estudio con la triple estimulación. A las 2h estimulación se observó un aumento significativo en los niveles de p-eNOS seguido por una caída sostenida que finalizó con una reducción significativa a las 24h (Figura 4B). El inhibidor de RhoA/ROCK, fue capaz de evitar las alteraciones en la fosforilación de eNOS a las 2h y 24h.

A



B



C

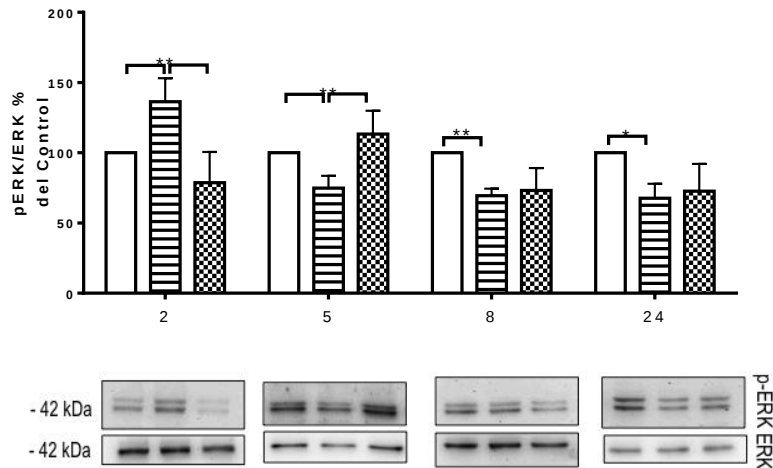
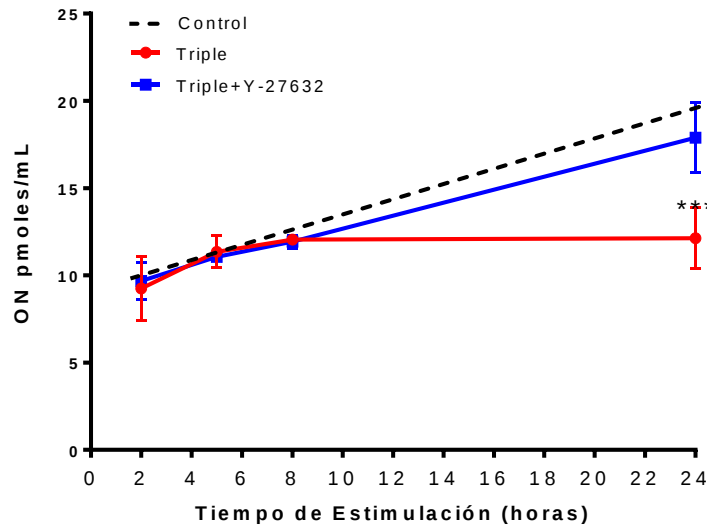


Figura 3. Activación de RhoA/ROCK, Akt y ERK en HUVEC estimuladas por 2, 5, 8 y 24 horas

Cuantificación de la actividad de: (A) p-MYPT y MYPT, (B) p-Akt y Akt y (C) p-ERK y ERK en HUVEC estimuladas a distintos tiempos con IL-6, AP e insulina. Los valores se expresan como porcentaje del control y las barras corresponden a la razón entre la proteína fosforilada y la total. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. n=5; ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test. *p<0,05, **<0,01.

A



B

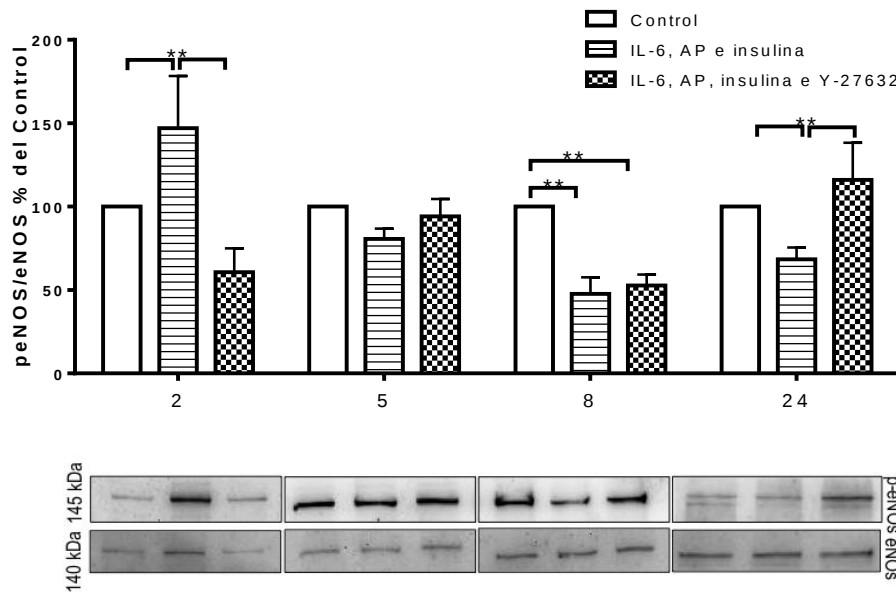


Figura 4. Niveles de Óxido Nítrico y actividad de eNOS en HUVEC estimuladas por diferentes tiempos

(A) Medición de ON por el reactivo de Griess en sobrenadante de células tratadas por 2, 5, 8 y 24h con la triple estimulación. (B) Cuantificación de la actividad de p-eNOS y eNOS en HUVEC estimuladas a distintos tiempos con IL-6, AP e insulina. Los valores se expresan como porcentaje del control y las barras corresponden a la razón entre la proteína fosforilada y la total. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. (A) $n=10$, (B) $n=5$; ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test $**p<0,01$, $***p<0,001$.

4.2.4 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en HUVEC

La producción de marcadores de estrés oxidativo es una característica del daño endotelial. Se midió la producción de ROS en los tiempos 2h, 5h y 8h por medio del método fluorimétrico con DCF-DA (dihidroclorofluoresceína diacetato) y a 24h colorimétricamente por la producción de TBARS (Sustancias Reactivas de ácido Tiobarbitúrico) y de AOPP (Oxidación Avanzada de Productos Proteicos).

IL-6, AP e insulina de manera conjunta incrementaron los niveles de ROS desde las 2h a las 8h (Figura 5A), y a las 24h produjeron un aumento significativo en los niveles de AOPP (Figura 5B) y TBARS (Figura 5C), efecto que no se observa con los componentes por si solos (datos no mostrados). La co-incubación con Y-27632 evitó el aumento de la producción de estos productos de ROS.

Adicionalmente, los niveles de Nrf2, un factor de transcripción clave para la síntesis de enzimas anti-oxidantes (61), se redujeron significativamente (36.8% respecto al control) en HUVEC tratadas con la combinación de los tres componentes en estudio por 24h. Este efecto se evitó aproximadamente en un 90% por la inhibición de RhoA/ROCK cuando se co-incubó con Y-27632 (Figura 5D).

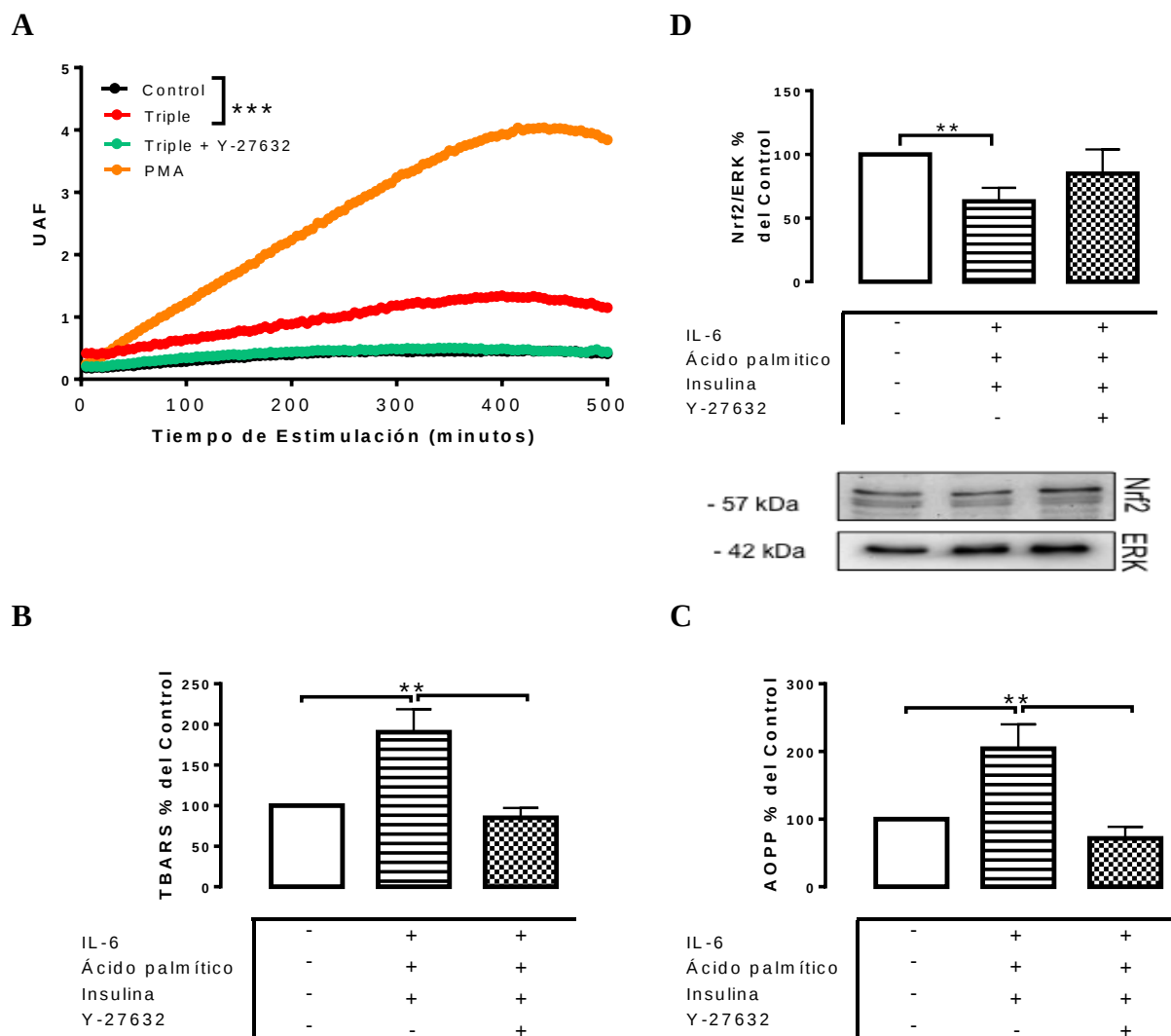


Figura 5. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno en HUVEC estimuladas con la triple por 2, 5, 8 y 24 horas. Cinética de la producción de ROS medido por (A) DCF-DA en células estimuladas desde 2 a 8h, (B) TBARS y (C) AOPP en extractos celulares (sobrenadante y lisado) luego de 24h de estimulación con IL-6, AP e insulina. (C) Cuantificación de los niveles de Nrf2 y ERK en HUVEC estimuladas por 24h con IL-6, AP e insulina. Las barras corresponden a la razón entre ambas proteínas y los valores se expresan como porcentaje del control. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. (A-D): $n=4$, (B-C) $n=3$ ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test $**p<0,01$, $***p<0,001$.

4.2.5 Estructura y morfología celular

En base al efecto de la triple estimulación en HUVEC a las 24h y a la relación de la activación de RhoA/ROCK con el citoesqueleto celular, se evaluó microscópicamente la morfología y estructura celular, observándose una alteración de la mono-capa y una pérdida de las uniones celulares evidenciadas por inmuno-tinción con VE-caderina. La inhibición de RhoA/ROCK por co-incubación con Y-27632 evitó estos cambios, rescatándose una mono-capa similar a la formada con células control (Figura 6A). Además, la triple estimulación indujo una alteración en las fibras de actina de las células que resulta en un cambio en la morfología al compararlas con células control. La presencia del inhibidor de RhoA/ROCK, además de evitar los cambios morfológicos, indujo un patrón difuso en el citoesqueleto de actina, descrito previamente por otros autores, luego de la inhibición prolongada de la actividad de GTPasas (19) (Figura 6A).

La cuantificación de los espacios intercelulares mostró que aquellos producidos por la triple estimulación fueron significativamente más frecuentes que los cuantificados en cultivos control (Figura 6B).

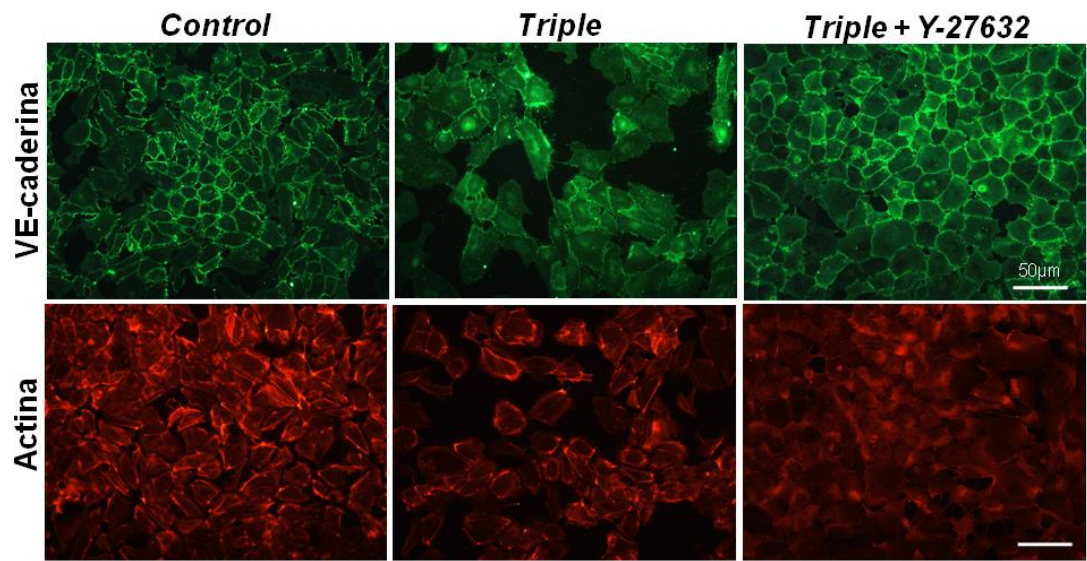
Para determinar si los cambios morfológicos se debían a una retracción celular o a anoikis (apoptosis por células despegadas de la matriz por el posible aumento de MMPs), se colectó el sobrenadante de los cultivos celulares luego de 24h de estimulación y se obtuvieron las células del sobrenadante por centrifugación las que se marcaron con anticuerpo anti CD146⁺ (marcador de células endoteliales) y se cuantificaron por citometría de flujo. El número de células en el sobrenadante no fue significativamente diferente entre las condiciones evaluadas (Figura 6C).

Interesantemente, observamos que a las 24 horas la triple estimulación sobre-activa la vía SRC evaluada por medio de su fosforilación, efecto que se evita por medio de la inhibición de RhoA/ROCK. Estas observaciones sugieren una alteración en la estructura y adhesión célula-célula que es mediada por la vía RhoA/ROCK (Figura 6D) (20).

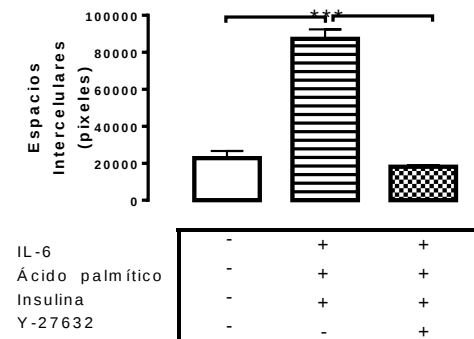
Adicionalmente, se midieron los niveles de actividad de MMP2 y MMP9 en sobrenadantes y lisados de células tratadas con la triple estimulación por 24h. Los resultados mostraron que la triple estimulación redujo la actividad de MMP2 en sobrenadante (Figura 7A) y aumentó los niveles de MMP9 en lisados (Figura 7B). La inhibición de RhoA/ROCK por

medio de la co-incubación con Y-27632 tendió a evitar el efecto de la triple estimulación sobre la actividad de las MMPs (Figura 6E).

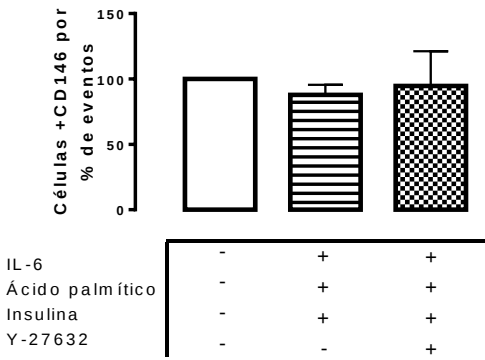
A



B



C



D

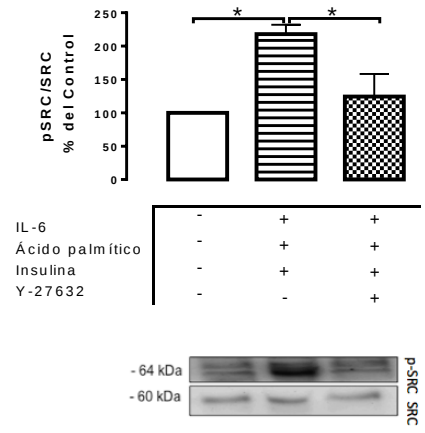
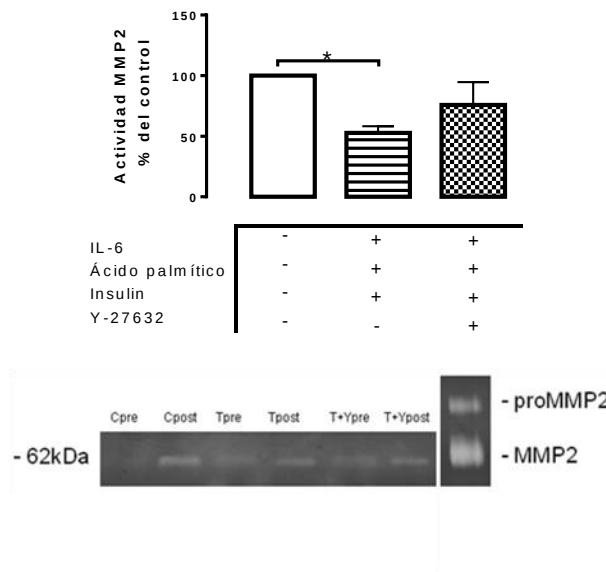


Figura 6. **Morfología celular en HUVEC estimuladas por 24 horas.** (A) Inmunocitoquímica representativa para VE-caderina y actina. Barras 50µm. (B) Cuantificación del área de espacios intercelulares por ImageJ y (C) cuantificación de eventos CD146+ por citometría de flujo en células estimuladas por 24h. (D) Cuantificación de western blots para p-SRC y SRC de lisados de células estimadas por 24h. Las barras corresponden a la razón entre ambas proteínas y los valores se expresan como % del control. Se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. n=4; ANOVA *no paramétrica de una vía*, Kruskal-Wallis *post hoc test* *p<0,05, ***p<0,001.

A



B

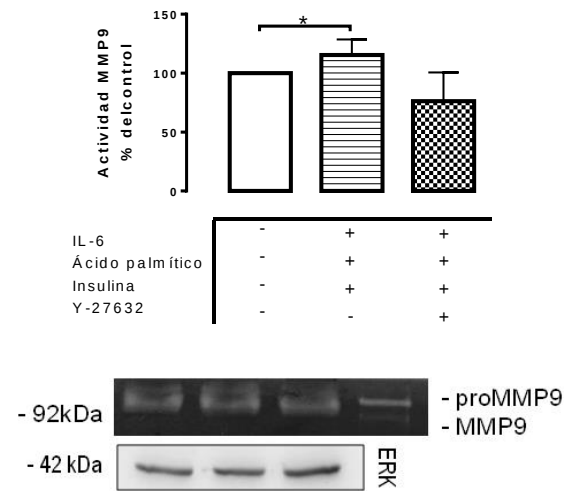


Figura 7. Actividad de MMP2 y MMP9

Cuantificación de zimografías de actividad de metaloproteasas en 35 µg de (A) sobrenadante o (B) lisados provenientes de células estimuladas por 24h con IL-6, AP e insulina. Las barras representan en (A) el valor obtenido en sobrenadantes posterior al estímulo menos el valor obtenido previo al estímulo y en (B) las barras corresponden a la razón entre la actividad de la metaloproteasa y ERK total. Ambas cuantificaciones se expresaron como porcentaje del control. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de las respectivas zimografías. n=4; ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test *p<0,05, ***p<0,001.

4.2.6 Niveles de Factor von Willebrand liberado y exposición de fibras en la superficie celular

Los resultados mostraron que después de 24h con la triple estimulación, se produjo un aumento en los niveles de FVW liberado, medido en el sobrenadante (Figura 8A) y se indujo la exposición de fibras de FVW sobre la superficie celular, detectado por inmunocitoquímica (Figura 8B). La inhibición de RhoA/ROCK solo redujo la exposición de fibras sobre la superficie celular pero no la liberación de FVW.

De manera inesperada, la estimulación con AP por sí solo produjo un dramático aumento en el FVW liberado y en la formación de fibras comparado al cultivo control e incluso a la triple estimulación.

4.2.7 Actividad pro-coagulante en HUVEC y adhesión plaquetaria a células endoteliales

Una característica adicional de un endotelio disfuncional es la pérdida de su capacidad anticoagulante y la adquisición de un fenotipo pro-coagulante (91). Así mismo, se ha descrito que la mayor adhesividad del endotelio a plaquetas constituye un fenómeno crucial en la DE y aterogénesis. Adicionalmente, el principal mecanismo por el cual se adhieren las plaquetas al endotelio es a través de su unión a las fibras de FVW. El modelo *in-vitro* permite estudiar estos fenómenos y evaluar su relación con la activación de RhoA/ROCK mediante la inhibición farmacológica.

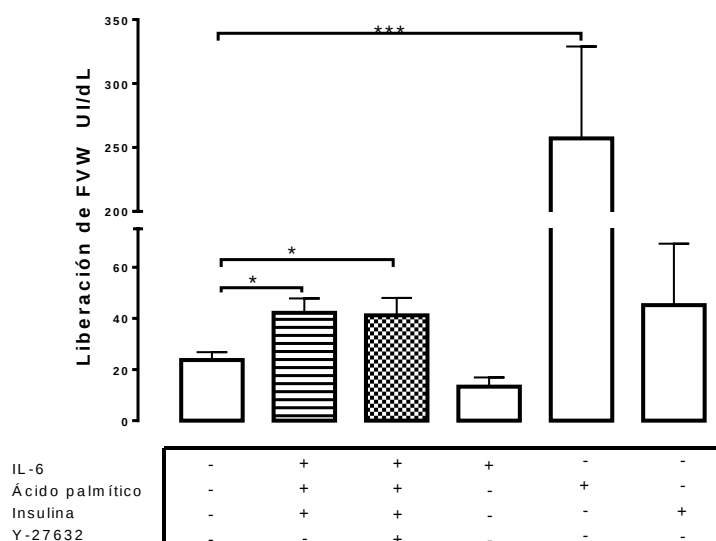
Como mencionado en la introducción, la célula endotelial solo expresa factor tisular cuando se activa, transformándola en pro-coagulante. En este contexto, se evaluó la actividad pro-coagulante (APC) dependiente del factor tisular presente en lisados de células endoteliales estimuladas, por el ensayo cromogénico, detallado en metodología. Se observó que la triple estimulación por 24h aumenta significativamente la actividad pro-coagulante en lisado de HUVEC, efecto que no se evitó inhibiendo la actividad de RhoA/ROCK (Figura 9A).

Por otro lado, en un sistema estático de evaluación de adhesión de plaquetas a células endoteliales, se observó que la triple estimulación por 24h incrementa significativamente el número de plaquetas adheridas a las células endoteliales, comparado al número de plaquetas adheridas en los cultivos control (Figura 9B). Concordante con la exposición de

FVW en la superficie endotelial, la estimulación con el AP indujo un aumento significativo de plaquetas adheridas al endotelio.

La inhibición de RhoA/ROCK, redujo significativamente la adhesión de las plaquetas al endotelio a cantidades comparables al control.

A



B

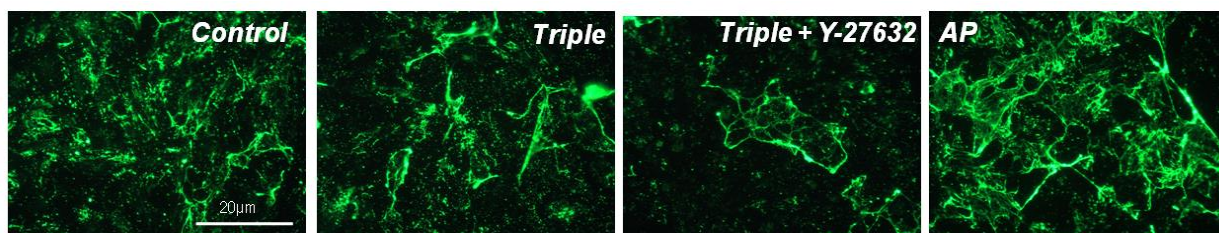


Figura 8. Niveles de Factor von Willebrand soluble y exposición de fibras en la superficie celular

(A) Medición de FVW soluble por ELISA, en sobrenadantes de células tratadas por 24h con IL-6, AP e insulina. (B) Micrografías representativas, de inmunocitoquímica para FVW, en células no permeabilizadas estimuladas por 24h. Barras 20µm. (A) n=6, (B) n=3; ANOVA no paramétrica de una vía,, Kruskal-Wallis post hoc test *p<0,05, ***p<0,001.

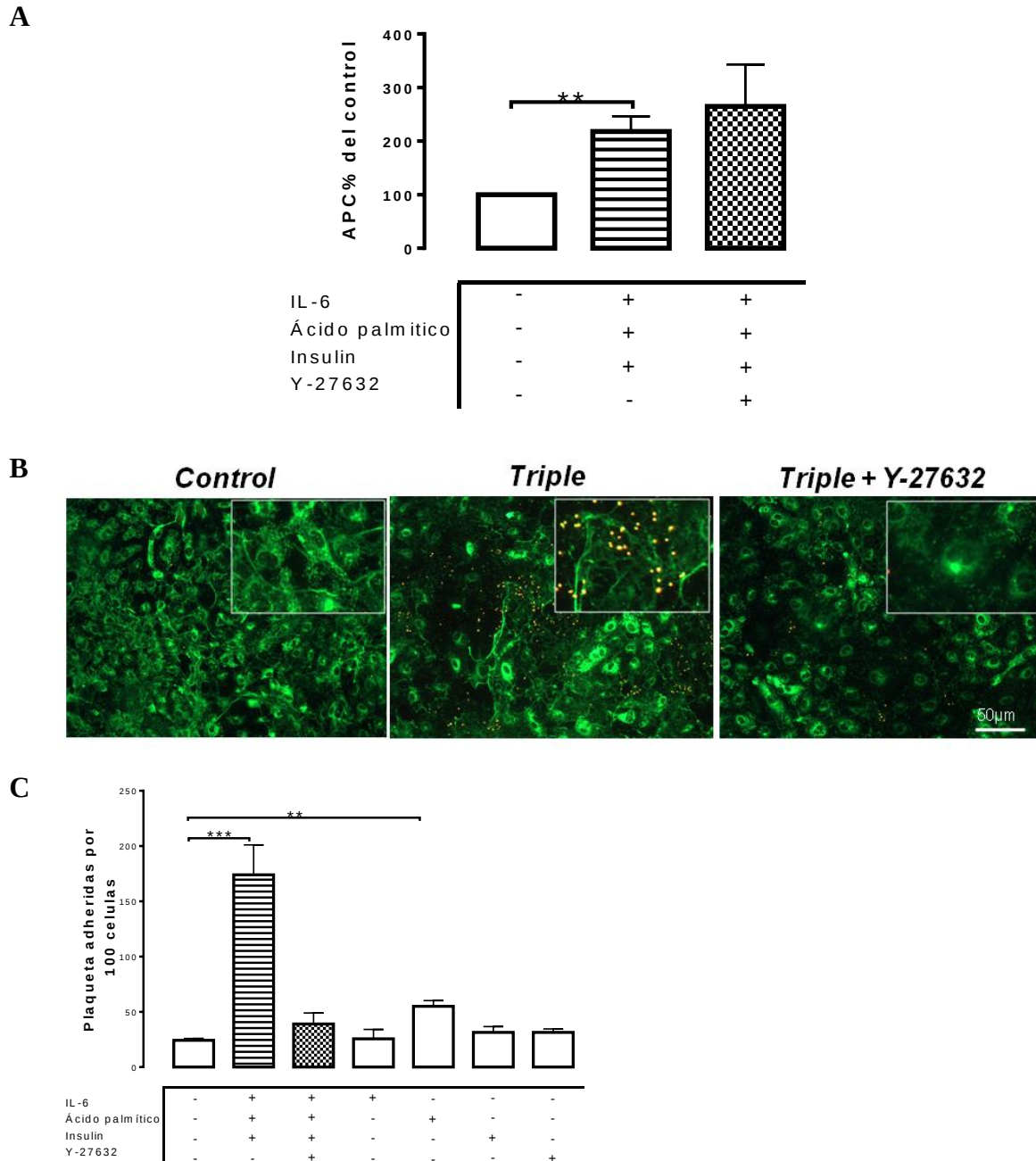


Figure 9. Actividad pro-coagulante en HUVEC estimuladas por 24 horas y adhesión plaquetaria

(A) Cuantificación de ensayo cromogénico para actividad procoagulante (generación de factor Xa) en lisados de células obtenidos en β -octil y estimuladas por 24h. (B) Micrografías representativas de inmunocitoquímica para VWF y GP1ba, en células permeabilizadas estimuladas por 24h y co-incubadas con plaquetas no activadas por 20 minutos. (C) Cuantificación de plaquetas adheridas a células endoteliales estimuladas por 24 horas. Barras 50 μ m. n=5 ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2.8 Niveles de MCP-1, sICAM-1, ácido úrico y E-Selectina

La liberación de mediadores pro-inflamatorios y pro-aterogénicos es otra característica de la activación y daño endotelial que da cuenta de una disfunción (92). Se evaluaron una serie de marcadores en sobrenadante de HUVEC estimuladas con IL-6, AP e insulina por 24h que dieran indicios del estado funcional del endotelio.

La triple estimulación produjo un aumento significativo en los niveles de MCP-1 (Figura 10A), sICAM-1 (Figura 10B) en el sobrenadante, lo que se previene significativamente co-incubando con Y-27632. Interesantemente, la triple estimulación indujo un aumento de los niveles de ácido úrico en sobrenadante (Figura 10C) y la inhibición de RhoA/ROCK evitó significativamente este aumento. Se evaluó la liberación de otros mediadores pro-inflamatorios como sCD40L, TNF- α y TGF- β , los que no mostraron diferencias significativas en relación a células no estimuladas (datos no mostrados).

Los niveles de E-selectina se midieron en lisados de HUVEC estimuladas por 24 h. La triple estimulación aumentó significativamente los niveles de E-selectina, en comparación a células control, lo que se evitó por medio de la co-incubación con Y-27632 (Figura 10D).

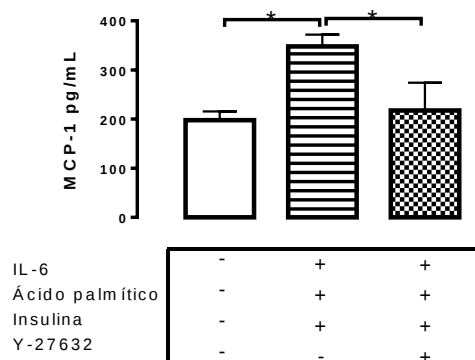
4.2.9 Almacenamiento de colesterol, lípidos neutros y triglicéridos en HUVEC

El rol del endotelio en el almacenamiento lipídico y las posibles alteraciones que la célula endotelial pudiera sufrir bajo estímulos relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, han sido poco estudiados. Teniendo en consideración que la triple estimulación incluye un ácido graso en concentraciones superiores a las presentes en el plasma de sujetos sin SM, se evaluó el contenido lipídico en HUVEC estimuladas con los tres compuestos en estudio. Los resultados de microscopía, en que se visualizan los micro-dominios de colesterol y ácidos grasos neutros en HUVEC, mostraron que la estimulación combinada con IL-6, AP e insulina por 24h aumenta el contenido lipídico intracelular comparado con las células estimuladas con vehículo (Figura 11A). En células estimuladas, co-tratadas con Y-27632, se observó un menor contenido de colesterol y lípidos intracelulares.

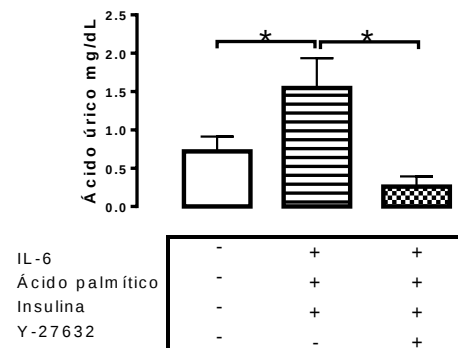
Adicionalmente se cuantificó, por un ensayo enzimático-colorimétrico, los niveles de triglicéridos, posterior a su conversión a mono-glicéridos, en lisados celulares. Se observó que la triple estimulación por 24h aumenta significativamente los niveles de triglicéridos intracelulares, en comparación con células no tratadas (Figura 11B). De manera equivalente

a las observaciones microscópicas, la inhibición de la RhoA/ROCK disminuyó este aumento.

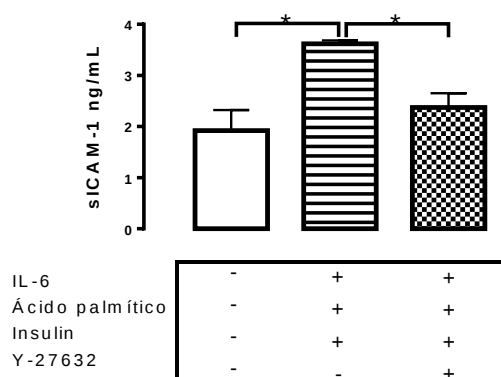
A



C



B



D

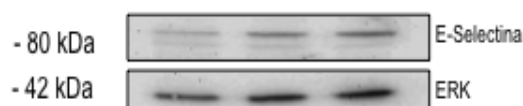
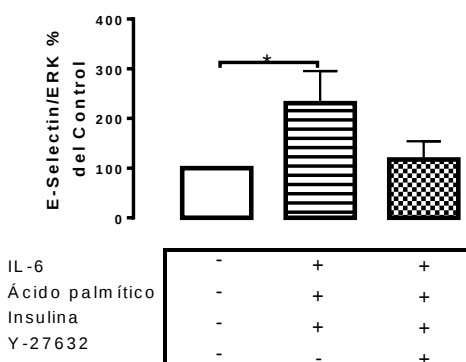
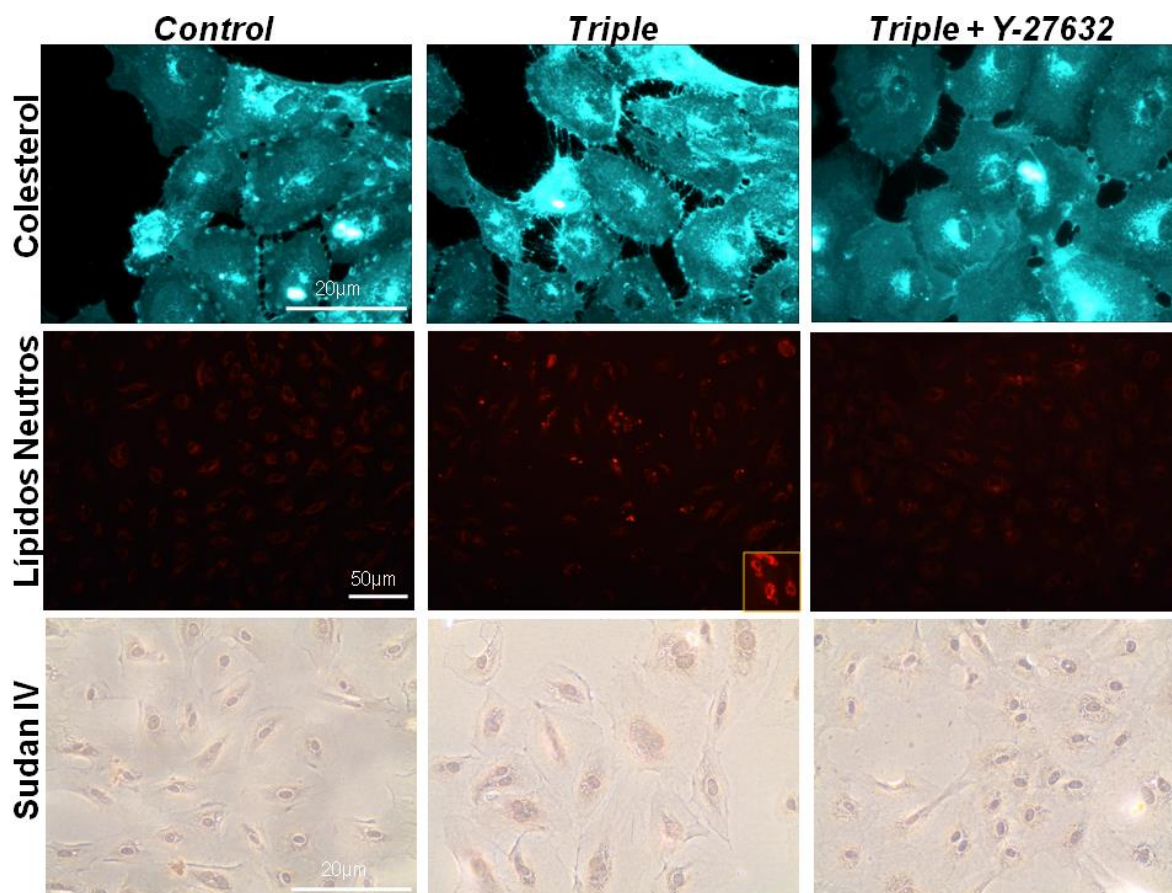


Figure 10. La estimulación por 24 horas con IL-6, AP e Insulina incrementa los niveles de MCP-1, sICAM-1 y ácido úrico en sobrenadante y E-selectina en lisados celulares

Niveles de (A) MCP-1 y (B) sICAM-1 en sobrenadante, de células estimuladas por 24h con IL-6, AP e insulina, determinados por ELISA y (C) niveles de ácido úrico medidos por un ensayo enzimático-colorimétrico. (D) Cuantificación de los niveles de E-selectina y ERK en HUVEC estimuladas a por 24h con la triple. Los valores se expresan como porcentaje del control y las barras corresponden a la razón entre la proteína y el control de carga. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. $n=3$; ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

A



B

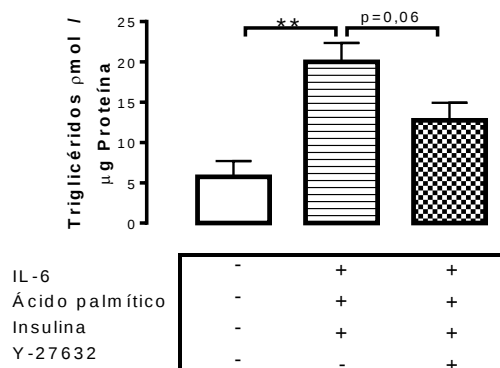


Figura 11. Almacenamiento de colesterol, lípidos neutros y triglicéridos en HUVEC.

(A) Micrografías de HUVEC teñidas para lípidos neutros (LipidTox), colesterol (filipina) y triglicéridos y lipoproteínas (Sudan IV), en células estimuladas por 24h con IL-6, AP e insulina y fijadas en formaldehído al 4%. n=3 (B) Cuantificación de triglicéridos por el ensayo colorimétrico-enzimático Biovision en lisados de células estimuladas por 24 horas con los tres compuestos. n=3 ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test **p<0,001.

4.3 Objetivo 3

4.3.1 Efecto de la dieta alta en grasa

Como se muestra en la figura 12, a partir de la segunda semana los animales alimentados con una dieta alta en AP mostraron una mayor masa corporal. Además la ganancia de peso semanal fue mayor en los animales alimentados con la dieta alta en grasa (Figura 13). A pesar de lo anterior, la tasa de alimentación en las primeras semanas fue menor en los animales alimentados con la dieta alta en grasa en comparación a los animales alimentados con dieta control (Figura 14). Por otro lado, en los animales con dieta alta en grasa, el aumento de peso fue significativamente menor durante las dos semanas de tratamiento con Fasudil, junto con una reducción en la tasa de alimentación.

A partir de las tres semanas, los animales alimentados con dieta alta en grasa presentaron un moderado aumento en la glicemia por sobre los rangos normales, el que se normalizó durante el transcurso del protocolo (Figura 15A). A las 14 semanas se observó que los animales alimentados con dieta alta en grasa presentaron una glicemia (Figura 15B), una insulinemia (Figura 15C) y un índice HOMA-IR (Figura 15D) significativamente mayores a las de los controles. El aumento en la insulina y HOMA-IR se revirtió con la administración de Fasudil, no así los cambios en glicemia.

A las 14 semanas de tratamiento con dieta alta en grasa se produjo una dislipidemia caracterizada por altos niveles de triglicéridos (Figura 16A) y colesterol total (Figura 16B), sin alteraciones en los niveles de HDL (no mostrados).

Los animales se observaron post mortem previo a la obtención de los tejidos, y en términos morfo-estructurales, se encontró que aquellos alimentados con dieta alta en grasa por 14 semanas presentaron una mayor área cubierta de tejido adiposo extraperitoneal (TAE) y circunferencia abdominal aumentada (Figura 17A-17B) en comparación a los animales con dieta control. La administración oral de Fasudil por dos semanas disminuyó la presencia de tejido adiposo extraperitoneal y la circunferencia abdominal (Figura 17C-17D).

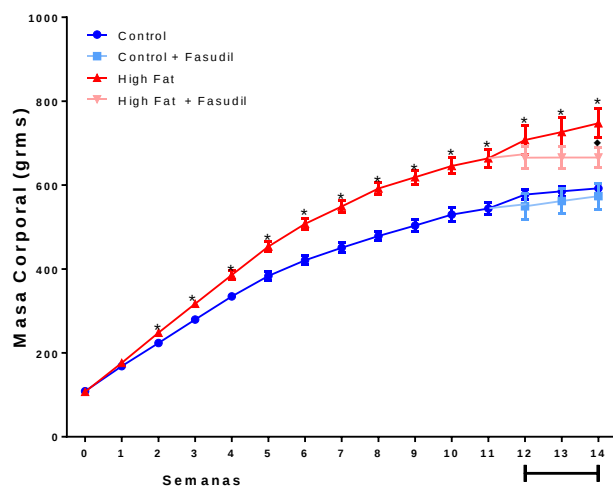


Figura 12. **Masa corporal**

Medición del peso por semana de animales no sedados. n=6 por grupo ANOVA *no paramétrica de una vía*, Kruskal-Wallis post hoc test * $p < 0,05$ Control vs High Fat, ♦ $p < 0,05$ High fat + Fasudil vs High Fat.

Figura 13. **Ganancia de peso**

Cuantificación de la ganancia de peso semanal de los animales en estudio, definida como la diferencia entre el peso de la Semana X_2 menos el peso en la Semana X_1 . n=6 por grupo ANOVA *no paramétrica de una vía*, Kruskal-Wallis post hoc test * $p < 0,05$.

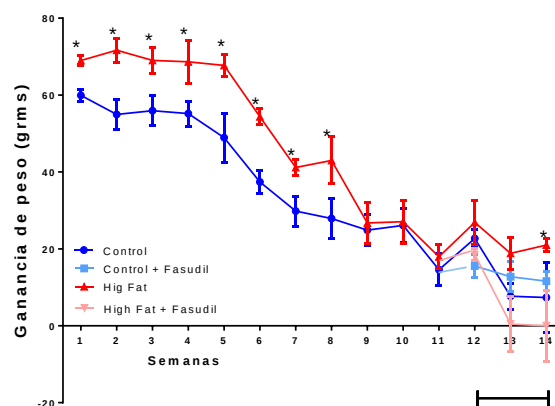
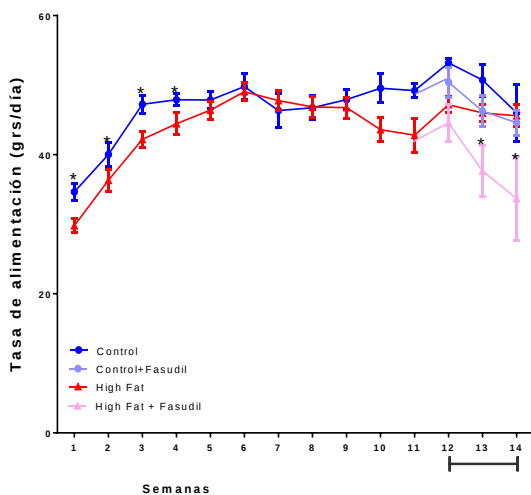


Figura 14. **Tasa de alimentación**

Cuantificación de la tasa de alimentación definida como el promedio de gramos de alimento consumido diario por semana. n=6 por grupo ANOVA *no paramétrica de una vía*, Kruskal-Wallis post hoc test * $p < 0,05$.



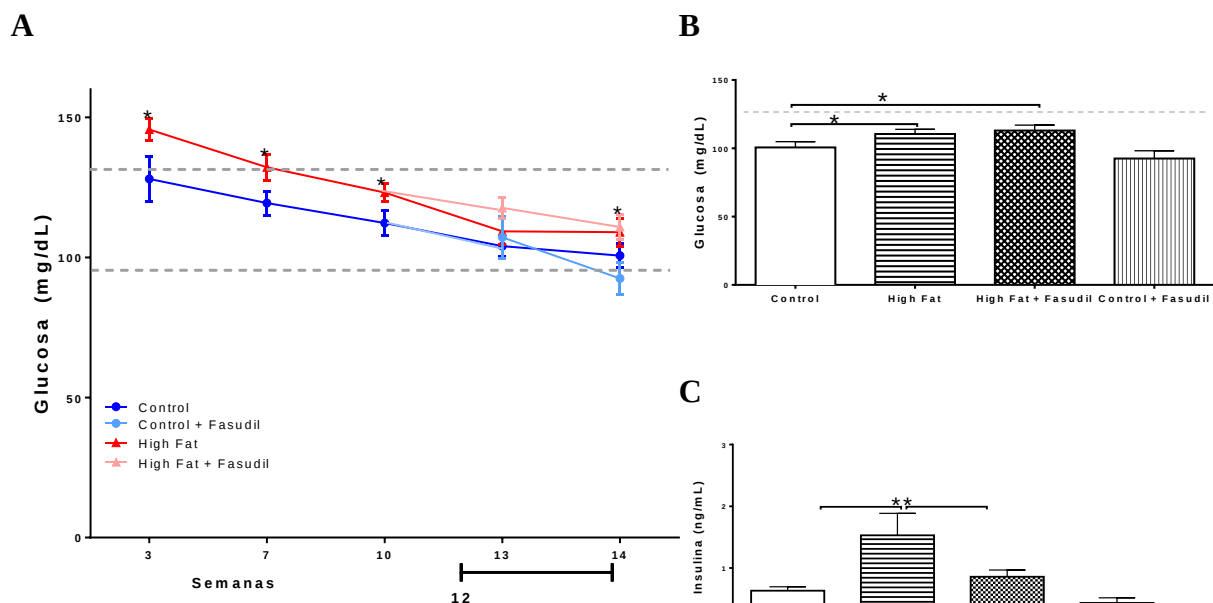


Figura 15. Glicemia, Insulinemia y HOMA-IR

(A) Medición cada tres semanas de los niveles de glucosa sanguínea posterior a 4 horas de ayuno por punción de cola (B) cuantificación de glicemia al final del protocolo en el laboratorio central de la Universidad Católica. (C) Medición de insulina por ELISA en suero de animales en la semana 14 previo al sacrificio. (D) Determinación de HOMA-IR definido como $\text{Glucosa (mg/dL)} \times \text{Insulina (mU/L)} / 405$. En línea punteada se grafica el rango de valores normales. $n=6$ por grupo ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test $*p<0,05$, $**p<0,001$.

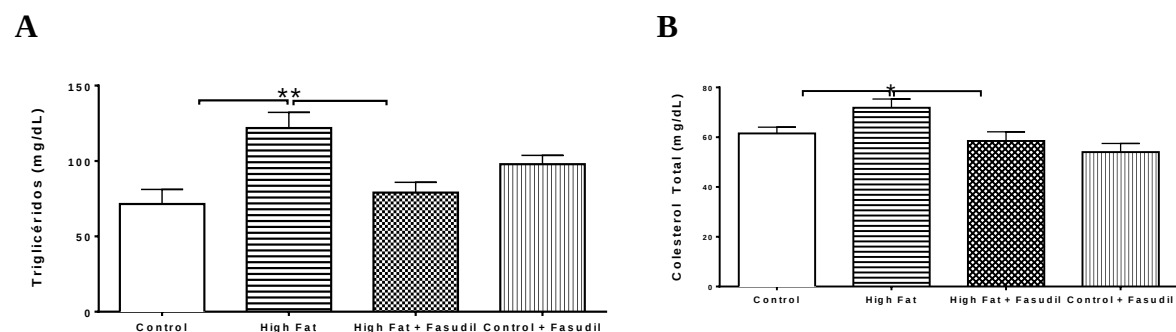
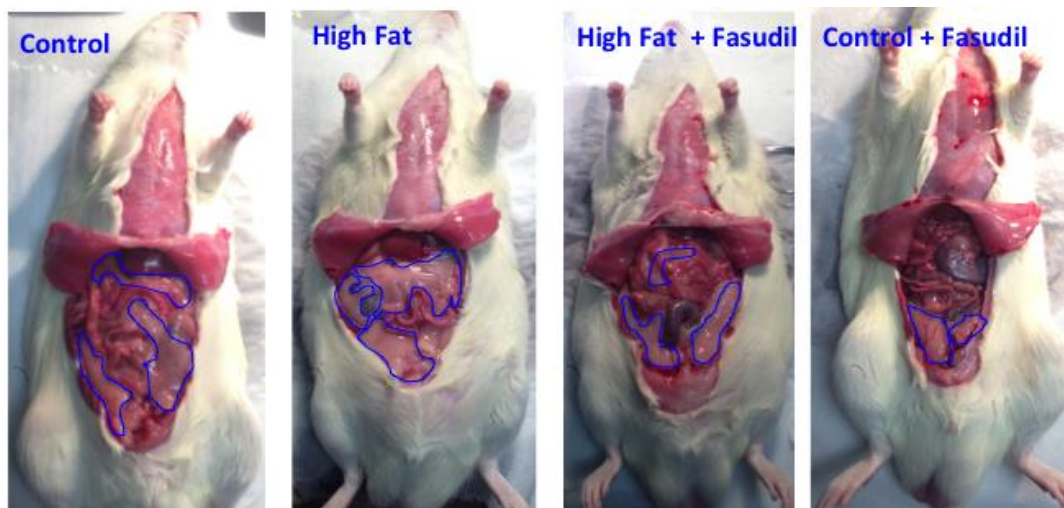


Figura 16. Triglicéridos y Colesterol Total

Medición en el laboratorio central de (A) triglicéridos y (B) colesterol en suero de animales en la semana 14 previo al sacrificio. ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test $*p<0,05$, $**p<0,01$.

A



B

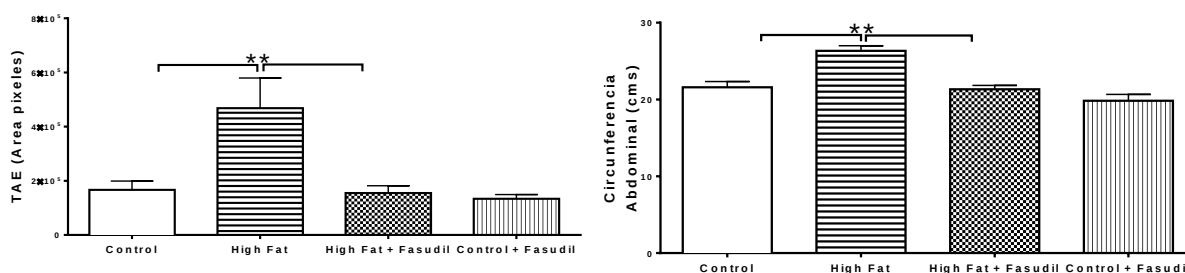


Figura 17. Tejido Adiposo Extraperitoneal y Circunferencia Abdominal

(A) Cuantificación relativa del área de tejido adiposo extraperitoneal con ImageJ en animales post sacrificio a la semana 14. Sobre el gráfico fotos representativas de los animales y de la zona limitada para medición. (B) Medición de la circunferencia abdominal en animales no sedados a las 14 semanas de protocolo. n=6 por grupo. ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test *p<0,05, **p<0,01.

Los animales alimentados con dieta alta en grasa por 14 semanas, mostraron mayor presión sistólica, aunque dentro del rango de normalidad (Figura 18A), junto con elevados niveles de ácido úrico (18B) y una disminución en los niveles de creatinina sérica (18C), alteraciones que también se revirtieron por el tratamiento de dos semanas con el inhibidor de RhoA/ROCK. Otros parámetros tales como peso del corazón, riñón, hígado y marcadores inespecíficos de inflamación hepática, evaluados macroscópicamente post eutanasia no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es posible establecer que la alimentación alta en grasa rica en AP por 14 semanas, indujo en los animales características de SM tales como sobre-peso, dislipidemia y un aumento en la presión arterial (sin llegar a niveles considerados HTA), en comparación a los controles.

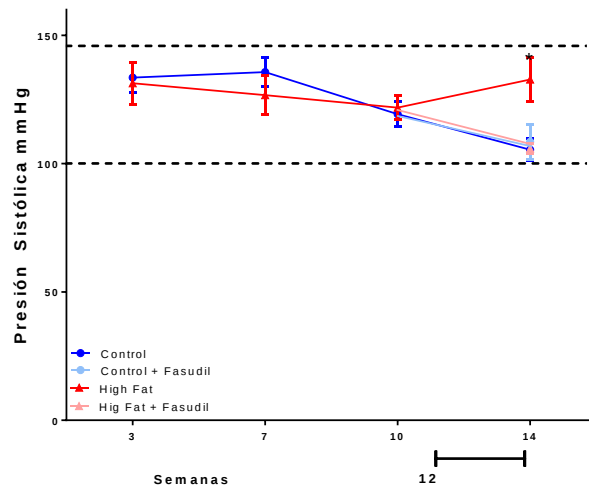
4.3.2 Marcadores de estrés oxidativo, de inflamación y de disfunción endotelial

Adicional a las alteraciones anteriormente descritas, producidas por la dieta alta en grasa por 14 semanas, se observó un aumento de TBARS (Figura 19A) y AOPP (Figura 19B) circulantes y una disminución significativa de los niveles Nrf2 en aorta (19C). Estos parámetros de estrés oxidativo se revirtieron con la administración de Fasudil vía oral por 2 semanas.

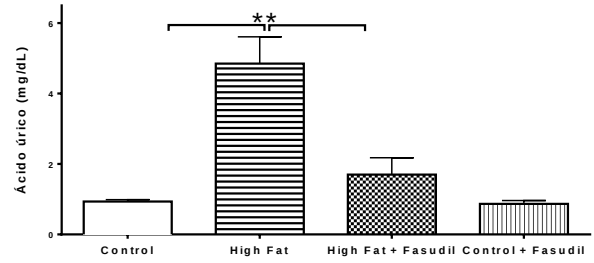
Por otra parte, los animales con características SM presentaron un aumento significativo de marcadores circulantes de inflamación y DE tales como IL-6, sICAM-1 y sCD40L (Figura 20A-20C), además de un aumento en los niveles de E-selectina en las aortas de estos animales (Figura 20D). A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de MCP-1 (Figura 20E).

El tratamiento por dos semanas con Fasudil revirtió el aumento en los niveles de marcadores de inflamación y DE y no produjo cambios significativos en los niveles de MCP-1. La medición de ON en suero, mostró que los animales alimentados con dieta rica en grasas presentan una reducción significativa de este metabolito en comparación a los controles (Figura 21A), junto con una disminución en la fosforilación de eNOS en la aorta (Figura 21B). El tratamiento con Fasudil por dos semanas revirtió la reducción de ON y la disminución de la actividad de eNOS en el tejido aórtico.

A



B



C

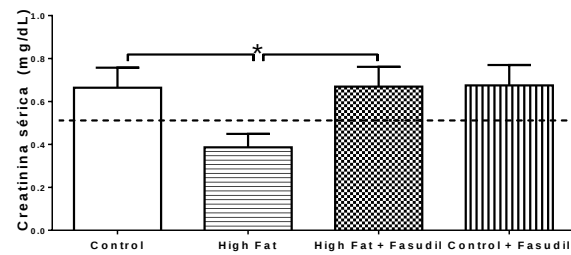
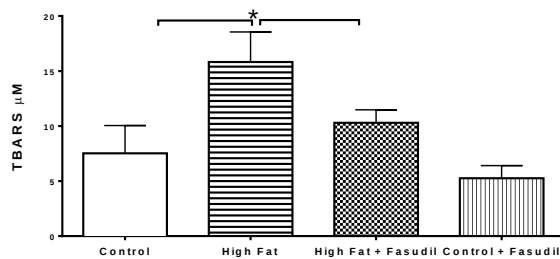


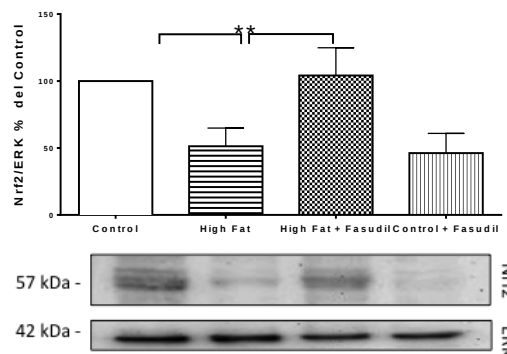
Figura 18. Presión Arterial Sistólica, Ácido Úrico y Creatinina

(A) Valores obtenidos por medición, cada 3 semanas por “tail cuff”, de la presión sistólica en animales no sedados. En línea punteada se grafica el rango de valores normales. Niveles de (B) ácido úrico y (C) creatinina en suero de animales en la semana 14 previo al sacrificio. n=6 por grupo ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test *p<0,05, **p<0,01.

A



C



B

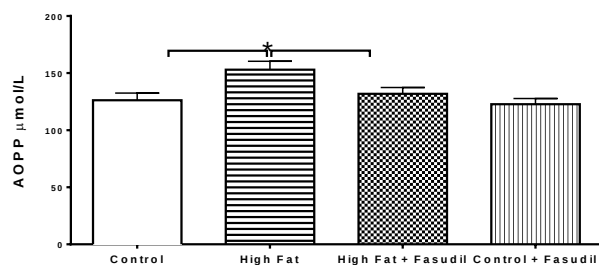


Figura 19. Marcadores de Estrés Oxidativo

Valores obtenidos de (A) TBARS y (B) AOPP en suero de animales en la semana 14, previo al sacrificio. (C) Cuantificación de los niveles de actividad de Nrf2 y ERK en 35 μg de lisados provenientes de aortas de animales a las 14 semanas de protocolo. Las barras corresponden a la razón entre las proteínas y los valores se expresan como porcentaje del control. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. n=6 por grupo ANOVA *no paramétrica de una vía*, Kruskal-Wallis *post hoc test* *p<0,05, **p<0,01.

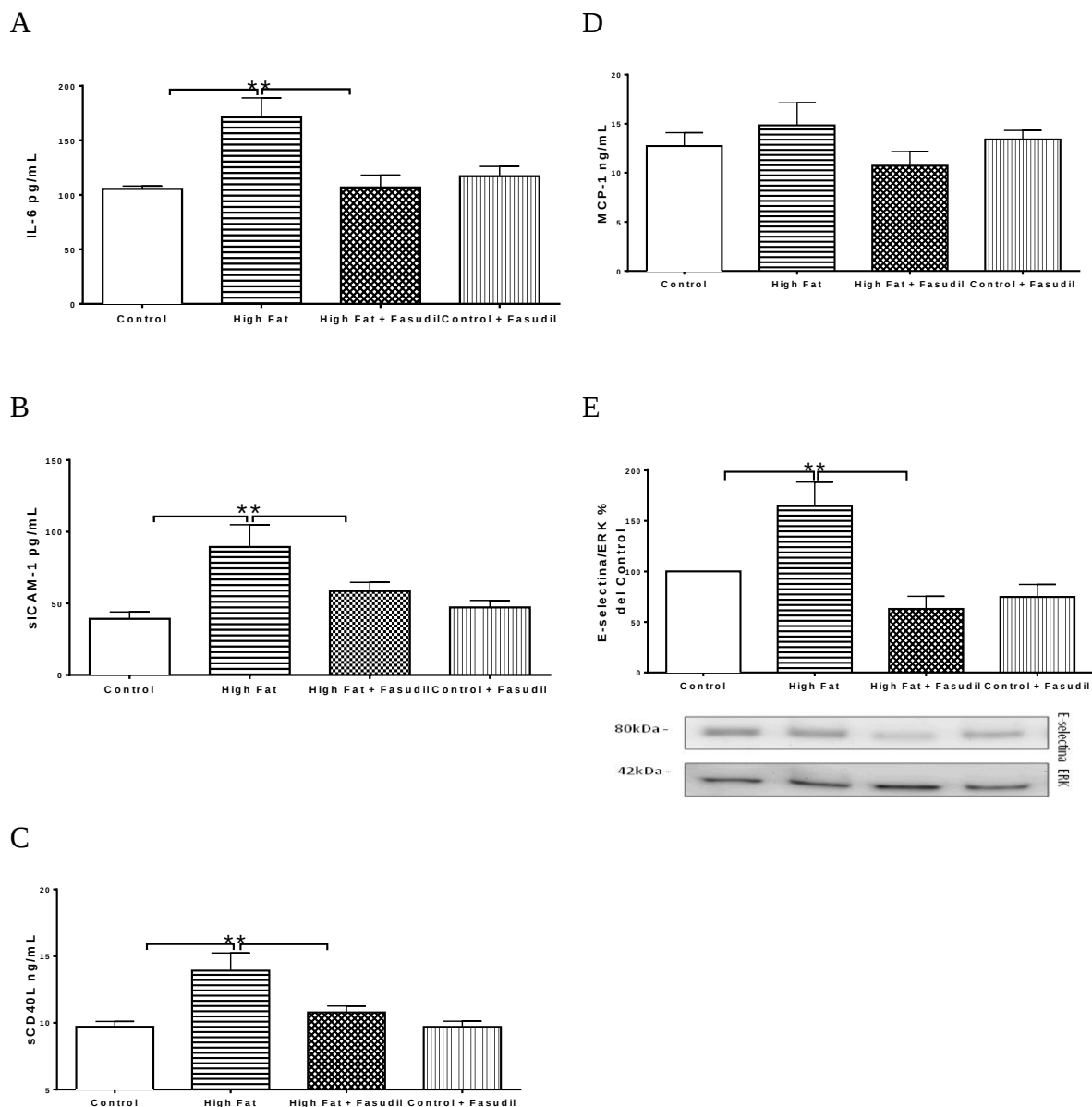


Figura 20. **Marcadores de Inflamación y Disfunción Endotelial**

Valores obtenidos por medición, de (A) IL-6, (B) sICAM-1, (C) sCD40L y (D) MCP-1 por ELISA en suero de animales en la semana 14 previo al sacrificio. (E) Cuantificación de los niveles de E-selectina y ERK en 35µg de lisados provenientes de aortas de animales a las 14 semanas de protocolo. Las barras corresponden a la razón entre las proteínas y los valores se expresan como porcentaje del control. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. n=6 por grupo ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test, **p<0,01.

4.3.3 Activación de vías de señalización RhoA/ROCK, PI3K/Akt, MAPK/ERK y actividad de MMP 2 y 9 en aortas

La dieta alta en grasa por 14 semanas produjo en las aortas de estos animales una sobre activación de RhoA/ROCK de aproximadamente un 35% (Figura 22A) y una disminución de aproximadamente un 30% de la actividad de PI3K/Akt (Figura 22B), respecto a los animales alimentados con dieta control. En los animales tratados con Fasudil, se observó una reducción de RhoA/ROCK y un aumento de Akt equivalente a los controles. Sin embargo, a diferencia de los estudios *in-vitro*, en las aortas de animales alimentados con dieta alta en grasa no se observaron cambios significativos en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 22C).

Adicionalmente, se detectó mayor actividad de MMP2 en aortas de animales alimentados con dieta alta en grasa comparado con los animales alimentados con dieta control (Figura 22D). Los animales que recibieron tratamiento con Fasudil no mostraron un aumento de MMP2 en aorta. Por otro lado, no se detectó actividad de MMP9 en el tejido en las condiciones estudiadas.

4.3.4 Histología de aortas, corazones y riñones

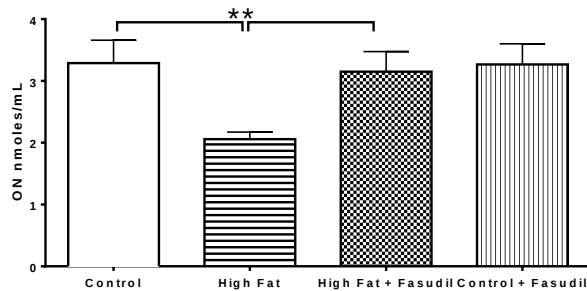
Observaciones microscópicas de la morfología mostraron un sutil engrosamiento ($p=0,06$) de la íntima-media entre animales alimentados con dieta alta en grasa comparado a los controles, visualizado por tinción Hematoxilina-Eosina (Figura 23).

Por otro lado, es posible detectar un aumento del infiltrado graso presente en el espacio sub-endotelial teñido con Sudan IV en las aortas de animales alimentados con dieta alta en grasa (Figura 24) en comparación con las aortas provenientes de animales controles. Esta infiltración disminuyó en animales tratados con el inhibidor de RhoA/ROCK. Las observaciones anteriores relacionadas a la infiltración de lípidos en el tejido se corroboraron al cuantificar triglicéridos por medio del ensayo colorimétrico-enzimático el que mostró que las aortas provenientes de animales alimentados con dieta alta en grasa presentan un aumento significativo en el contenido de triglicéridos en comparación a las aortas de los controles. El tratamiento con Fasudil revirtió este aumento lipídico en el tejido aórtico (Figura 24B).

La evaluación histológica del corazón, por tinción de Von Gieson (Figura 25A), mostró un aumento sutil en el área de fibrosis, rica en colágeno, expresado como “índice de fibrosis” en los animales alimentados con dieta HF (Figura 25B). A pesar de esto, no se observó diferencia en el número de zonas fibróticas (Figura 25C). El tratamiento con Fasudil revirtió el aumento del índice de fibrosis sin alterar

Observaciones microscópicas de riñones teñidos con hematoxilina-eosina no mostraron diferencias entre los tejidos de animales controles, alimentados con dieta HF y/o los tratados con Fasudil (datos no mostrados).

A



B

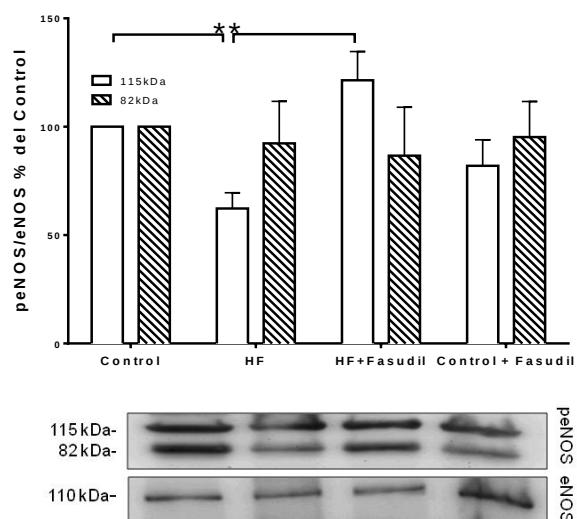


Figura 21. **Niveles de Óxido Nítrico circulantes y actividad de eNOS en aorta**

Medición de (A) ON por el reactivo de Griess en suero deproteinizado de animales previo al sacrificio en la semana 14. (B) Cuantificación de los niveles de de p-eNOS y eNOS en 35µg de lisados provenientes de aortas de animales a las 14 semanas de protocolo. Los valores se expresan como porcentaje del control y las barras corresponden a la razón entre la proteína fosforilada y la total. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. n=6 por grupo ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test, **p<0,01.

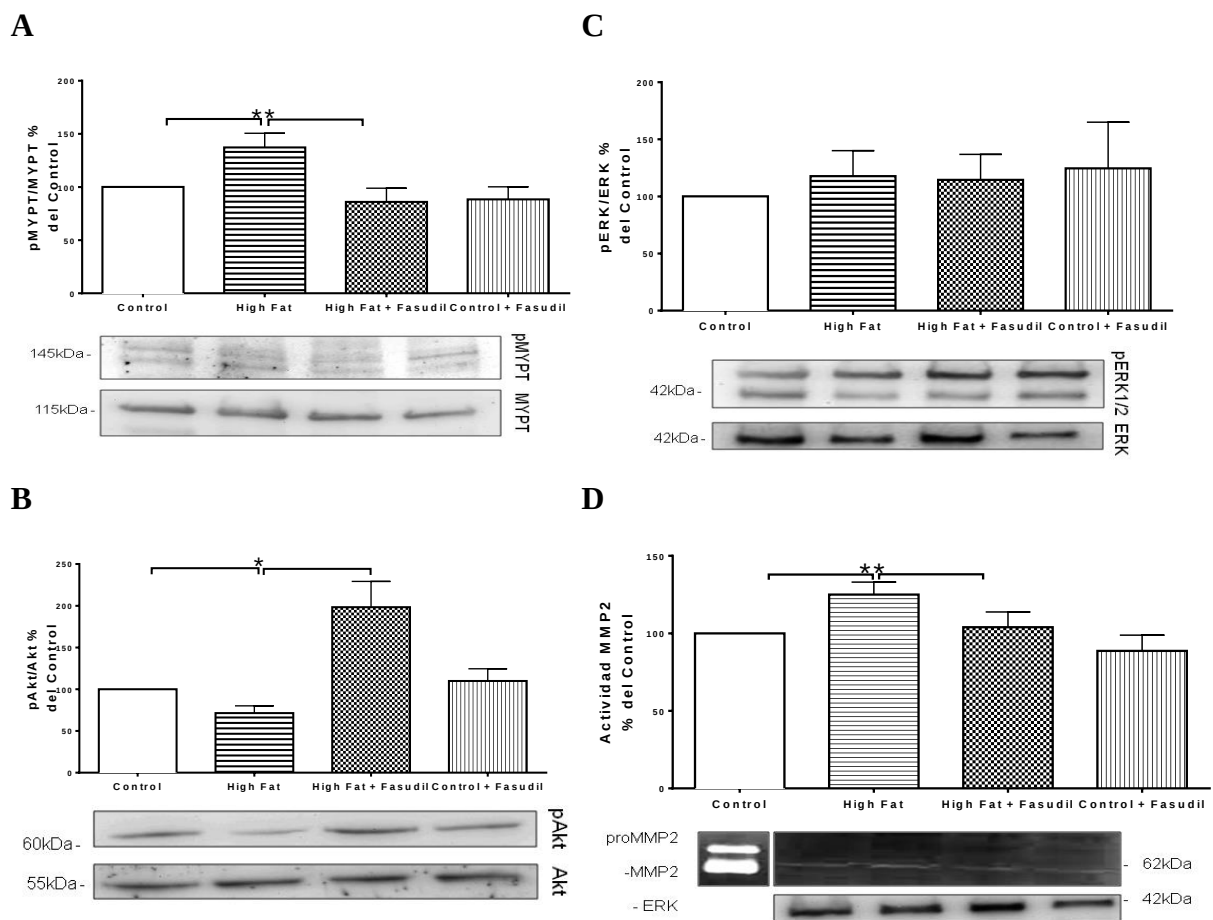


Figura 22. Vías de Señalización y actividad de MMPs en aortas

Cuantificación de los niveles de: (A) p-MYPT y MYPT, (B) p-Akt y Akt y (C) p-ERK y ERK en 35 μ g de lisados provenientes de aortas de animales sacrificados a las 14 semanas. Los valores se expresan como porcentaje del control y las barras corresponden a la razón entre la proteína fosforilada y la total. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de los respectivos western blots. (D) Zimografía de actividad de metaloproteinasas en 35 μ g de lisados provenientes de aortas de animales posterior a las 14 semanas de protocolo, las barras corresponden a la razón entre la actividad de la metaloproteinasas y ERK total. Las cuantificaciones se expresan como porcentaje del control. Bajo los gráficos se muestran fotos representativas de un gel de zimografía. n=6 por grupo ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test, *p<0,05, **p<0,01.

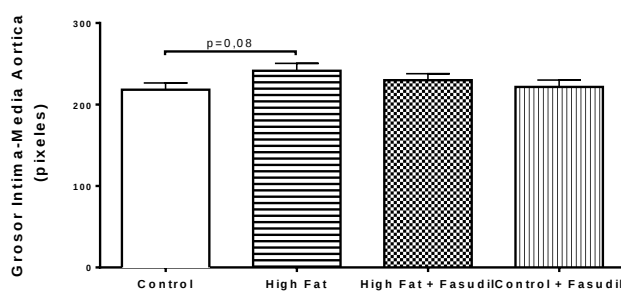
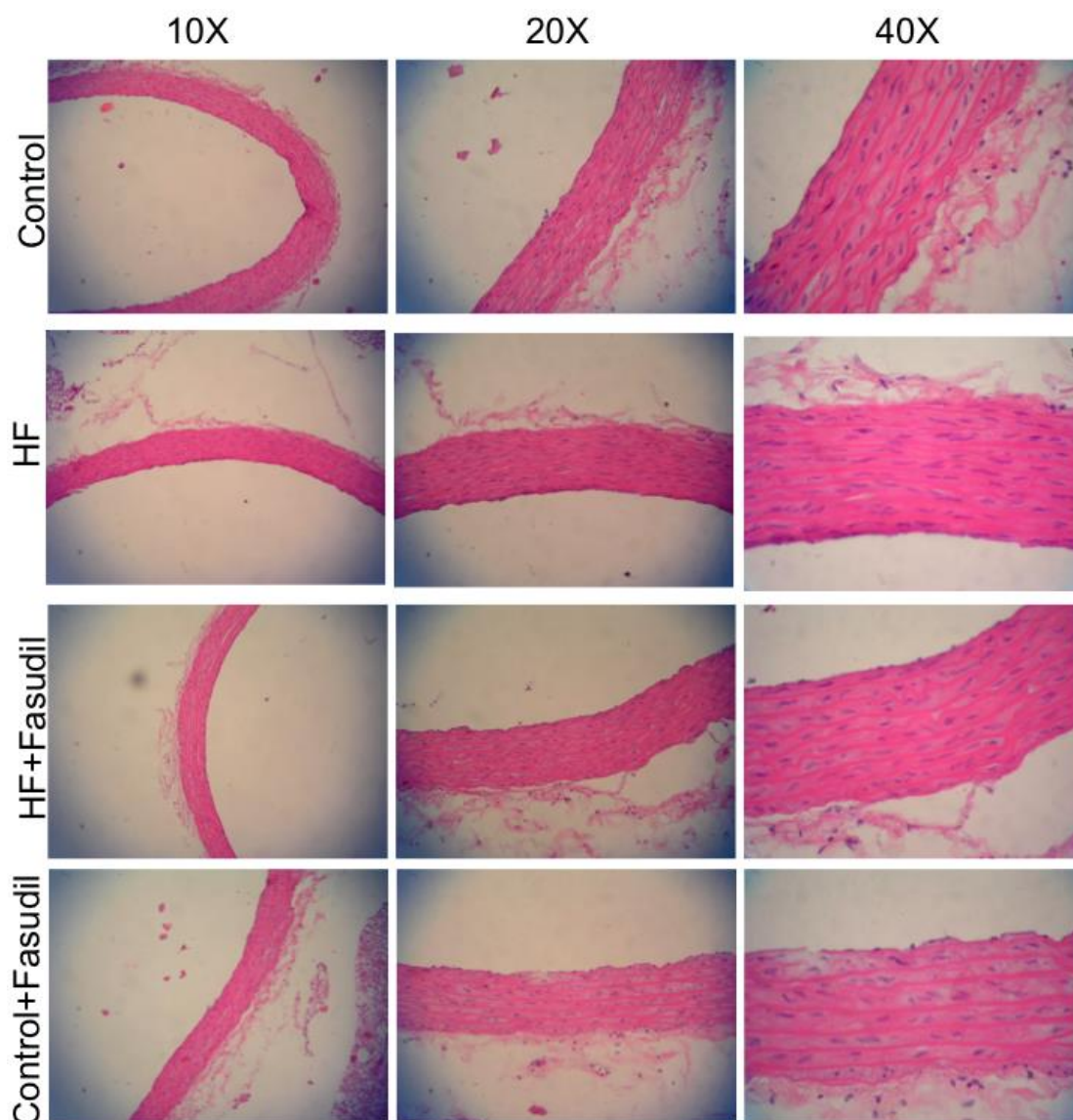
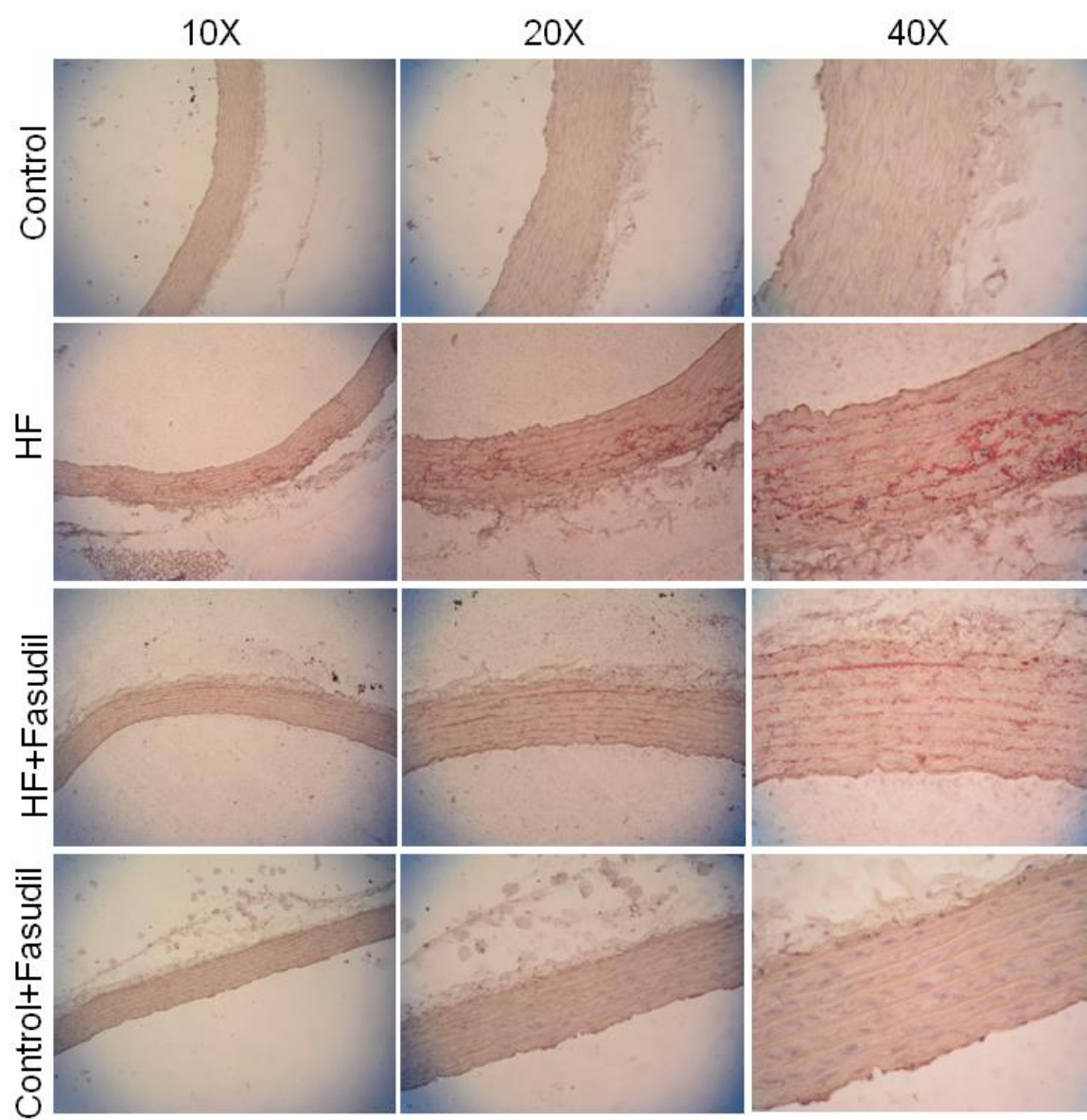


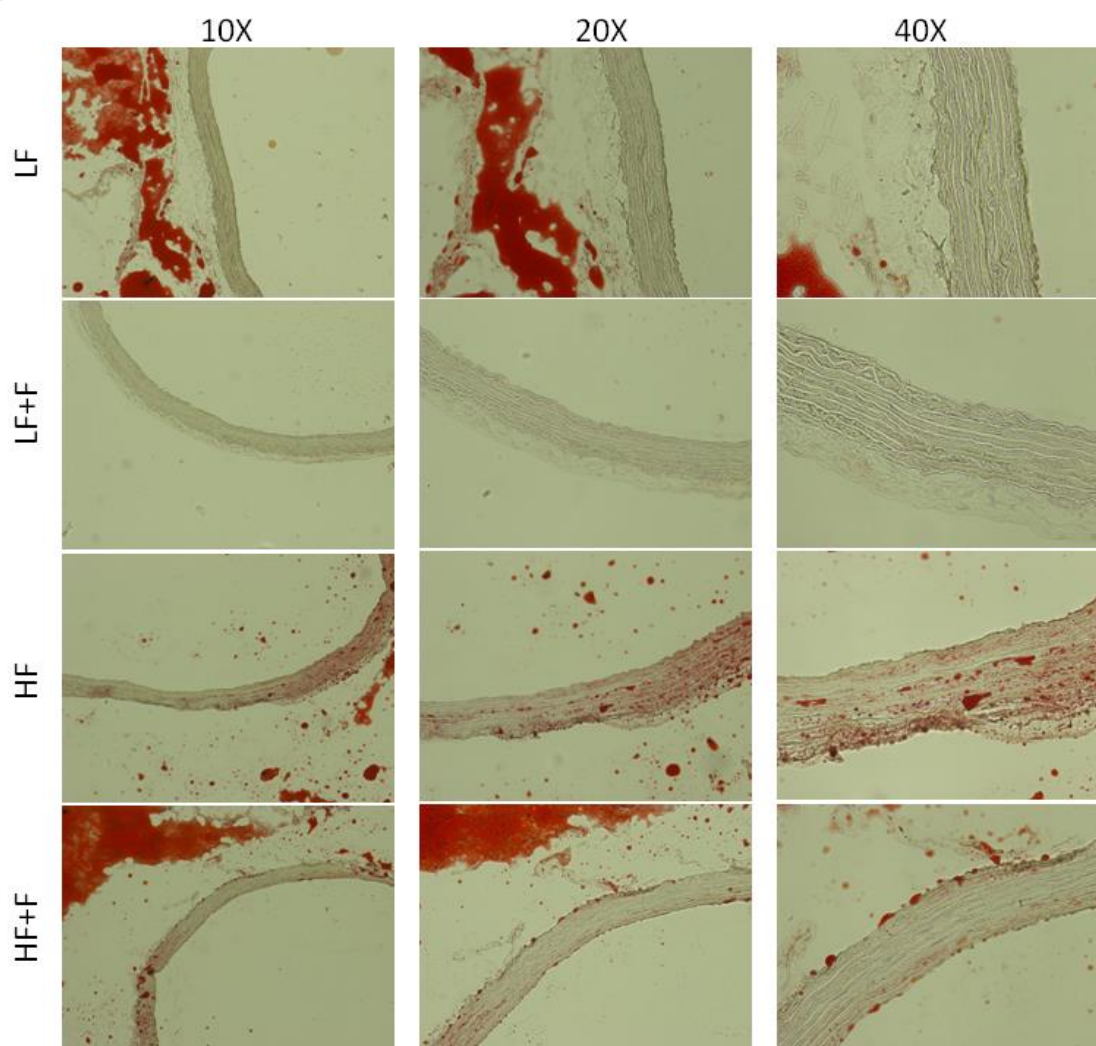
Figura 23. Morfología de la Aorta

Micrografías representativas de cortes (4 micras) de aortas de animales sacrificados a las 14 semanas fijadas, en paraformaldehído al 4% y teñidas para hematoxilina-eosina. La cuantificación del engrosamiento de la íntima se realizó con ImageJ y se definió como la sección entre el lumen y el borde exterior. Los valores representan 4 mediciones “ciegas” de 4 imágenes por aorta. n=6 aortas por grupo ANOVA no paramétrica de una vía, Kruskal-Wallis post hoc test .

A



B



C

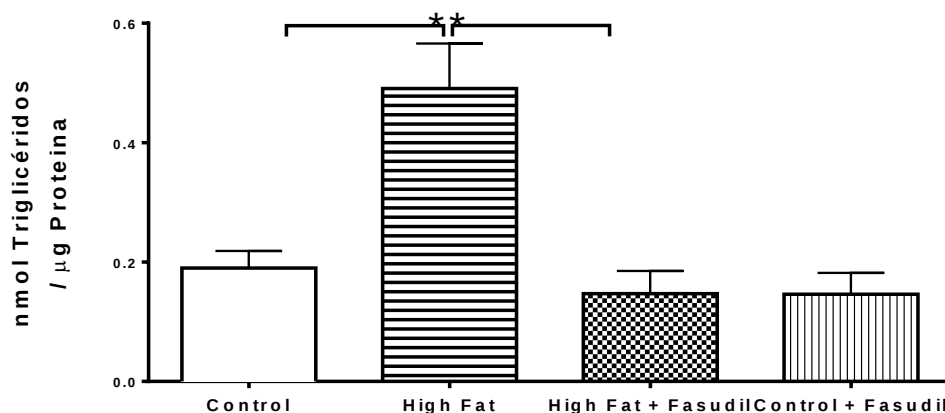


Figura 24. **Infiltración y contenido graso de la aorta**

(A) Micrografías representativas de cortes (4 micras) de aortas de los animales sacrificados a las 14 semanas fijadas en paraformaldehído 4% y teñidas para Sudan IV. (B) Micrografías representativas de cortes (7 micras) de aortas de los animales sacrificados a las 14 semanas fijadas en OCT y teñidas para Lipid Oil Red. (C) Cuantificación de triglicéridos por el ensayo colorimétrico-enzimático Biovision en lisados de aortas provenientes de ratas sacrificadas al final del protocolo. n=6 por grupo ANOVA no paramétrica de una vía. Kruskal-Wallis post hoc test, **p<0,01.

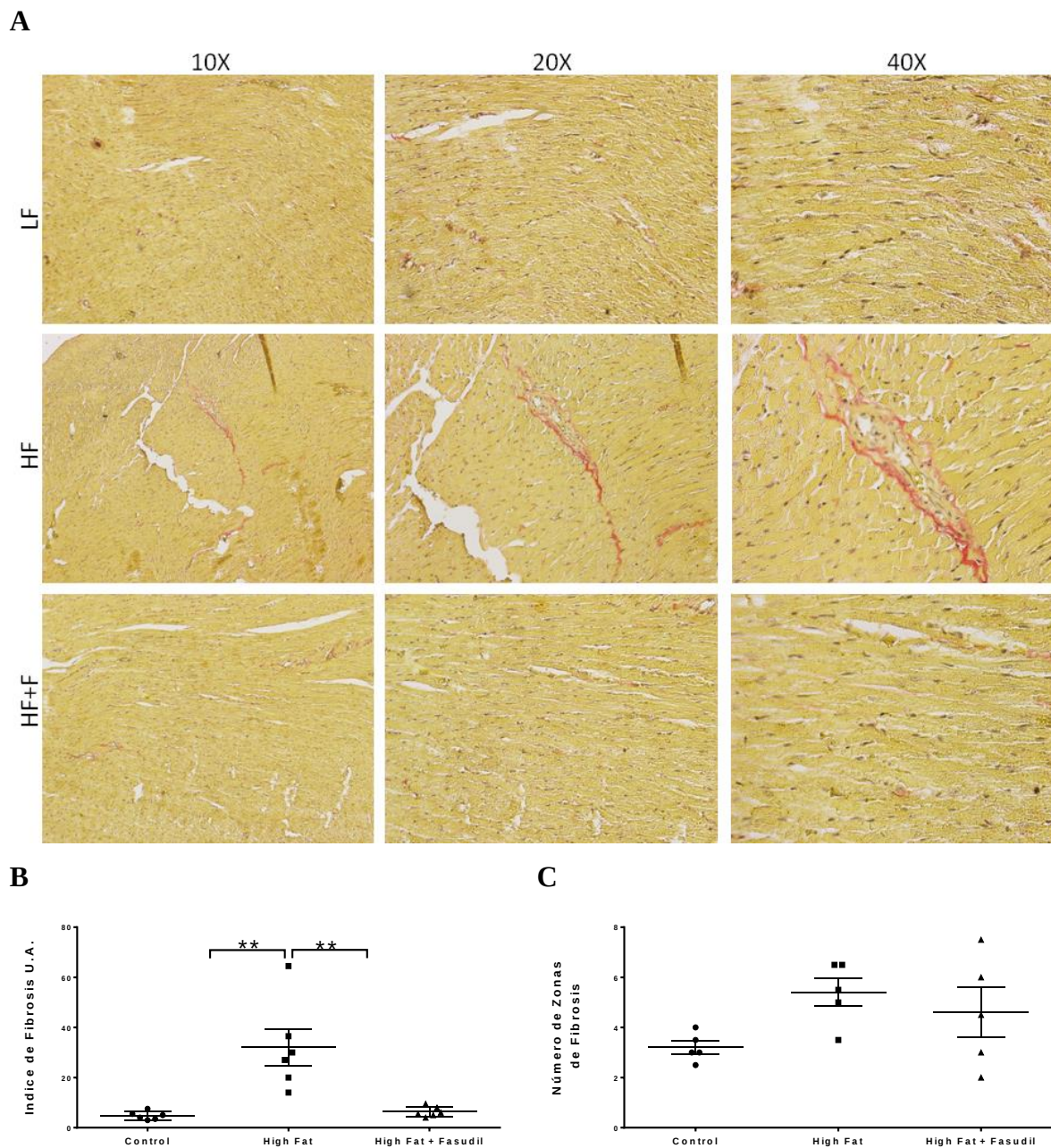


Figura 25. **Fibrosis cardiaca**

(A) Micrografías representativas de cortes (4 micras) de corazón de los animales sacrificados a las 14 semanas fijadas en paraformaldehído al 4% y teñidas para Van Gieson. (B) Cuantificación del índice de fibrosis de 4 zonas por corazón y (C) cuantificación de número de zonas de fibrosis en 4 zonas por corazón. n=6 por grupo ANOVA no paramétrica de una vía. Kruskal-Wallis post hoc test, **p<0,01.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que en comparación a los sujetos controles, el grupo de sujetos jóvenes con circunferencia de cintura aumentada, sobrepeso y dislipidemia (hipertrigliceridemia y bajos niveles de HDL), pero sin diabetes ni hipertensión, presentan niveles elevados de marcadores de inflamación, estrés oxidativo, signos de DE y niveles elevados de AP sumado a una sobre activación de la vía RhoA/ROCK. Este estado pro-aterogénico y pro-inflamatorio había sido reportado solo en sujetos adultos mayores con SM incluyendo diabetes, obesidad o hipertensión clínicamente diagnosticadas (80), pero se desconocía si este estado se encontraba presente en jóvenes en etapa “subclínica” del SM.

Adicionalmente, los resultados obtenidos mostraron que IL-6, insulina y AP, que representan alteraciones características del SM tales como un estado pro-inflamatorio, desbalance del metabolismo de la glucosa y dislipidemia se encuentran elevadas en el grupo de sujetos con SM. Estas moléculas indujeron en células endoteliales en cultivo, alteraciones relacionadas con DE que fueron en gran parte mediadas por la sobre-activación de RhoA/ROCK.

La participación de la activación de RhoA/ROCK en relación a características del SM se mostró además en el modelo *in-vivo* de ratas alimentadas por 14 semanas con dieta alta en grasa saturada, rica en AP e intervenidas farmacológicamente con Fasudil por dos semanas. En general, los resultados obtenidos permiten evidenciar la presencia de marcadores asociados a mayor riesgo cardiovascular en sujetos jóvenes con SM pero sin otra sintomatología evidente que el sobrepeso y desbalance lipídico. Los resultados obtenidos de los estudios *in-vitro* e *in-vivo*, permiten sugerir que la mayor actividad de RhoA/ROCK encontrada en los sujetos con SM comparada con los control, podría mediar en gran parte las alteraciones relacionadas con DE y pro-aterogénesis que se observaron en estos pacientes.

5.1 RhoA/ROCK

La activación anormal de la vía RhoA/ROCK ha sido relacionada con un mayor riesgo de ECV (93). Un ejemplo de esto es el artículo de Gabrielli y colaboradores donde mostraron una sobre-activación de la vía RhoA/ROCK en leucocitos periféricos de pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular izquierda, entregando una asociación de este indicador con el daño cardiovascular (94). La sobre-activación de la vía RhoA/ROCK también ha sido reportada en sujetos adultos con SM (edad promedio 55 años) (80). Por otra parte, la participación de la vía Rho/ROCK en la función endotelial queda de manifiesto en un artículo reciente en donde se observó que en sujetos adultos mayores con SM la inhibición local de ROCK con Fasudil durante una hiper-insulinemia inducida, produce una mejora en la respuesta vasodilatadora (81).

No obstante lo anterior, esta tesis muestra por primera vez que esta sobre-activación también ocurre en sujetos jóvenes con SM, pero sin diabetes tipo 2 ni hipertensión.

Es factible medir la actividad de RhoA/ROCK *ex-vivo* en leucocitos periféricos, demostrándose la sobre activación de esta vía en pacientes adultos con diabetes tipo 2 e hipertensión (80). Además basados en una reciente publicación, en ratas infartadas la sobre-activación de RhoA/ROCK en leucocitos se asoció con el daño cardiovascular observado (95). Sin embargo, resulta necesario conocer la participación efectiva de la activación de RhoA/ROCK en las manifestaciones endoteliales involucradas en SM. *In-vitro*, el modelo celular permite estudiar el mecanismo de activación de RhoA/ROCK. Sáez y colaboradores han estudiado la DE en un modelo de HUVEC estimulado con cocaína, donde también han observado la activación de la vía RhoA/ROCK (76). Sin embargo, a nuestro conocimiento no hay estudios que relacionen la activación de esta vía en respuesta a la estimulación con IL-6, solamente se ha estudiado el rol de esta vía de señalización en la alteración fisiológica de células de cáncer gástrico estimuladas con esta citoquina (96). Por otra parte se ha estudiado la sobre activación de RhoA/ROCK por insulina en altas concentraciones, en células pancreáticas, pero tampoco existe evidencia de la activación de esta vía en el endotelio en respuesta a la hormona (97).

En esta tesis se utilizó HUVEC en cultivo primario como modelo *in-vitro*. En este modelo, se demostró que al estimular células endoteliales con IL-6, AP e insulina, tres moléculas que están elevadas en jóvenes con SM, se activa la vía RhoA/ROCK desde 2 a 24h y que simultáneamente se observa una disminución en la actividad de ERK y Akt a las 24h. Estos resultados sugieren que la estimulación prolongada de la vía Rho/ROCK podría tener participación en las alteraciones posteriores en la señalización que lleven finalmente a la DE. Concordante con estos resultados, otros autores han demostrado que la administración de IL-6 por sí sola inhibe la fosforilación de Akt (98) y activa la vía ERK (99) a tiempos cortos entre 15 minutos a 7.5 horas. A su vez insulina, es capaz de activar Akt (100) y ERK (101) en un rango de tiempo entre 1 a 6h. El efecto de AP en relación a estas vías de señalización en el endotelio se desconoce, por lo que es posible sugerir que la combinación de estas moléculas que presentan diferentes efectos en los tiempos prolongados, generaría la reducción en la actividad de Akt y ERK junto con una sobre activación de RhoA/ROCK, algo que no ha sido reportado con anterioridad. Los resultados obtenidos para la actividad de las tres enzimas podrían distinguir dos etapas generales de respuesta temporal. Antes de las 5 primeras horas de estímulo se observa un aumento de la actividad de las tres enzimas sugiriendo una respuesta fisiopatológica de fase temprana (posible respuesta aguda). Sin embargo, a tiempos más prolongados de estímulo, 8 y 24h, se observa que la actividad de RhoA/ROCK permanece aumentada mientras que la actividad de Akt y ERK está disminuida. La respuesta a tiempos prolongados de estimulación (24h) es diferente a tiempos cortos ya que a 24h de estímulo predomina la sobre activación de RhoA/ROCK al mismo tiempo en que la actividad de ERK y Akt están disminuidas.

Estudios de angiogénesis *in-vitro*, en HUVEC co-cultivadas con fibroblastos, han demostrado que hay un efecto opuesto entre ERK y RhoA/ROCK. La inhibición de ERK produce una sobre activación de RhoA/ROCK que promueve las alteraciones del citoesqueleto (102). Estas observaciones han sido apoyadas por modelamientos bioinformáticos que muestran la regulación inversa entre ambas vías (103).

Cabe mencionar que además de estas vías, evidenciamos que a las 24h con la estimulación con IL-6, AP e insulina se sobre activa SRC la que se inhibe con la co-incubación con Y-27632 sugiriendo que esta vía está relacionada con RhoA/ROCK. Se ha reportado que la fosforilación de SRC es inducida por el aumento del estrés oxidativo (104) generando

importantes alteraciones del citoesqueleto (105). Estudios en células de cáncer gástrico (106) de colon (107) y dinámica de matriz extra-celular (108) han evidenciado la conversación cruzada entre RhoA/ROCK y SRC. La activación de una de ellas induce la activación de la otra, generando un eje de regulación positiva entre estas dos señalizaciones intracelulares.

Pese a que la información adquirida con un modelo celular puede entregar conocimiento relevante respecto a vías celulares, es sabido que los efectos sistémicos no necesariamente son reflejo de los efectos que se pueden observar en un cultivo celular. Por lo anterior se quiso comprobar si los resultados observados en el cultivo eran también replicables en un modelo animal, que podría ser más fácilmente correlacionado con los efectos observados en humanos. Con el modelo animal de SM fue posible demostrar una sobre activación de la vía RhoA/ROCK en las aortas de estos. Reportes previos en ratas diabéticas, han evidenciado el rol de esta vía en el proceso de daño vascular (109). Más aún, la inhibición de esta vía es capaz de reducir el fenotipo pro-adhesivo presente en el endotelio dañado bajo esta condición patológica (110). En concordancia con estos hallazgos, otros autores han reportado que la actividad de Akt se encuentra disminuida en aortas de ratas con SM inducido por dieta alta en grasa (111). Además se ha sugerido que el proceso es dependiente de los receptores PPAR γ y PPAR δ ya que la actividad de Akt se restaura con la administración de Rosiglitazona, agonista de los PPAR (112).

Interesantemente, en nuestro modelo animal pudimos observar que al inhibir por dos semanas la vía RhoA/ROCK, la ganancia de peso se detuvo junto con producirse una disminución en la tasa de alimentación. Uno de los principales ejes de la regulación del apetito se asocia con las hormonas leptina y grelina (*ghrelin*) (113). La hiperleptinemia es un fenómeno que se observa en obesidad (113). *In-vitro* existe evidencia que esta hormona sobreactiva la vía RhoA/ROCK en adipocitos (114), además al inhibir esta vía se previenen los efectos dañinos de la leptina (115) específicamente, los relacionados a la hipertrofia del cardiomiocito (116). Por otro lado, se han observado bajos niveles de grelina en obesidad (117). Estudios *in-vivo* han mostrado que esta hormona reduce los niveles del mRNA de ROCK1 a nivel pulmonar y vascular (118). A pesar de esto, a nuestro conocimiento, no existen trabajos que relacionen al SM y la inhibición de RhoA/ROCK con cambios en el eje de control del apetito e ingesta alimentaria. Es por esto, que como proyección del estudio

de esta tesis podría resultar interesante medir en este modelo animal los niveles circulantes de leptina y grelina.

Con los resultados obtenidos, no queda completamente claro si la disminución en la ganancia de peso o la mera inhibición de esta vía fue la causante de revertir los marcadores de daño endotelial y las alteraciones metabólicas observadas. Como proyección y ya conocidos estos resultados, para evaluar si el efecto es por la reducción de la ingesta alimentaria, se podría agregar un grupo experimental en el que a las 12 semanas se les diera una cantidad de alimento equivalente a la consumida por los animales con dieta alta en grasa y fasudil, es decir, someterlas a una restricción calórica.

5.2 Estrés Oxidativo y Óxido Nítrico

El grupo de sujetos SM mostró una menor biodisponibilidad de ON y niveles elevados de marcadores de estrés oxidativo (AOPP y TBARS), en comparación a sujetos sanos. Este desbalance sugiere un proceso de DE en curso (119). A pesar de que previamente se ha reportado que los niveles de marcadores de estrés oxidativo están elevados en pacientes mayores de 50 años, diabéticos con SM (120), los resultados de esta tesis muestran que el estado oxidativo ya se encuentra alterado en los sujetos jóvenes con SM estudiados.

Se ha reportado que la IL-6 y los ácidos grasos libres, por si solos, son capaces de inhibir la actividad de eNOS y la producción de ON (121, 122).

Por otra parte se ha señalado que la insulina tiene un efecto dependiente de la concentración que se utilice para estimular las células endoteliales, así a bajos niveles, entre 5 a 10nM, se promueve la producción de ON (123) pero en altos niveles, como aquellos presentes en los sujetos SM estudiados en esta tesis (alrededor de 100nM), su efecto sería inhibitorio (54).

A nivel endotelial está ampliamente aceptado que RhoA/ROCK regula negativamente la fosforilación de eNOS por medio de la inhibición de Akt (124) lo que causa una menor producción de ON (125). En otros tipos celulares, como lo son el cardiomiocito, las células de la musculatura lisa vascular y células pulmonares, el ON actúa como un inhibidor de la vía RhoA/ROCK, evitando el efecto dañino que su sobre activación tiene sobre estos tipos celulares (126-128)

Considerando el desbalance de ON y estrés oxidativo como una características del daño endotelial, otros autores han mostrado como la IL-6, en concentraciones 100 veces mayores

a las utilizadas en esta tesis, induce la producción de ROS por medio de la activación del sistema renina-angiotensina (129). Por otra parte, se ha descrito que el AP, al doble de la concentración utilizada en esta tesis y por 12h, ejerce un efecto apoptótico en las células endoteliales con lo que induce estrés oxidativo (130). Este efecto apoptótico no fue observado en nuestro trabajo cuando se estimularon 24h las células endoteliales con 0,5mM de AP por si solo. Por otro lado, no se ha reportado de manera fehaciente el efecto de la insulina como inductor de estrés oxidativo, sino que por el contrario, ciertos reportes sugieren que al promover la síntesis de ON, se induce un aumento en los niveles del factor de transcripción Nrf2 (131) sugiriendo un rol anti-oxidante, en concentraciones fisiológicas. En esta tesis se reporta de manera novedosa como la incubación de HUVEC con estos tres compuestos administrados en conjunto y en concentraciones similares a las presentes en los sujetos con SM, induce estrés oxidativo y a la vez causa una reducción en los niveles de Nrf2.

Estudios en modelos animales de diabetes y SM se ha reportado una importante reducción en la fosforilación de eNOS (111) y de Akt junto con una reducción en los niveles de ON (132). Por otra parte, se ha demostrado que la inhibición de eNOS, genera hipertensión en ratas (133), condición patológica en la que es sabido que la vía RhoA/ROCK esta sobre-activada. En hipertensión, los niveles de especies reactivas de oxígeno están aumentados (134). Por otra parte se sabe que un aumento en ROS puede activar RhoA/ROCK. Por lo tanto, el estrés oxidativo podría ser el mecanismo por el cual se asocia la hipertensión y la vía RhoA/ROCK.

En ratas diabéticas se observa una reducción significativa de los niveles de ON a nivel de corteza renal (135), junto con una disminución en los niveles de Nrf2 en aortas (136) y esto estrechamente relacionado a un daño renal crónico, causado por el estrés oxidativo (137).

En modelos de obesidad también se ha evidenciado la disminución de los niveles de ON (138) con el aumento de marcadores de estrés oxidativo (139). En el caso particular de esta tesis resulta novedoso el demostrar que en un estado previo a la hipertensión y/o diabetes existe una disminución significativa en los niveles circulantes de ON, un aumento en el estrés oxidativo, junto con una reducción en la actividad de eNOS y en los niveles de Nrf2 en la aorta de rata.

5.3 Inflamación

El estado pro-inflamatorio es una de las características en todas las etapas de la aterogénesis (140). Interesantemente, en el grupo de sujetos con SM evaluados en esta tesis, se observaron niveles elevados no solo de IL-6, sino también de MCP-1, sCD40L y hsPCR, en comparación al grupo control, sugiriendo un proceso silente de pro-aterogénesis, previo al desarrollo de las manifestaciones clínicas. En adultos obesos sobre 40 años de edad, se ha reportado la presencia de altos niveles de citoquinas características de inflamación crónica tales como IL-6, interesantemente en niveles muy cercanos a los valores observados en los sujetos jóvenes con SM evaluados en nuestro estudio (29). Esto evidencia el grado de daño ya presente en el grupo estudiado de jóvenes sin diabetes ni hipertensión.

En el año 2001, Marín y colaboradores describieron un “círculo vicioso” entre IL-6 y MCP-1, en el que ambas moléculas potencian el efecto inflamatorio y pro-coagulante del endotelio (141). Paralelamente está descrito que el AP a tiempos cortos (3h) induce la liberación de MCP-1 de manera dependiente de la vía NF-kB que es la vía clásica por la cual se estimula la producción de MCP-1 y potencia la respuesta inflamatoria mediada por este complejo proteico (142). Por otra parte, se ha descrito que la estimulación de células endoteliales con insulina por 2 días, a las concentraciones usadas en esta tesis, inhibe la expresión de MCP-1 (143). Sin embargo, en esta tesis mostramos que la estimulación conjunta por 24h con IL-6, AP e insulina en concentraciones similares a las presentes en pacientes con SM aumenta los niveles de MCP-1 liberado por la célula endotelial. La diferencia entre estos resultados podría estar dada por la presencia de IL-6 y AP en el medio de estimulación, otorgándole características mas patológicas a este conjunto de moléculas.

Reportes de las últimas décadas han mostrado como otro marcador de DE y de daño cardiovascular como es sICAM-1, se libera en respuesta a TNF- α e IL-1 β (144) y también se observa ese efecto con IL-6 (145) y AP por si solos (146). No existen reportes que muestren el rol de insulina en la síntesis y liberación de esta molécula. Nosotros observamos que la triple estimulación por 24 produce un aumento en los niveles de sICAM-1 y en base a la bibliografía sugerimos que se pueda deber principalmente por el efecto de IL-6 y AP.

Esta tesis entrega evidencia *in-vitro* sobre las alteraciones en los niveles de E-Selectina luego del estímulo prolongado (24h) con la combinación con IL-6, AP e insulina, en concentraciones similares a las encontradas en sujetos con SM. La E-selectina es una de las principales moléculas de adhesión en las células endoteliales (147). Esta molécula también se encuentra en la musculatura lisa de forma normal, pero cuando se sobre-expresa, es considerada un marcador de daño endotelial. Se ha observado que las interleuquinas entre las que se encuentran IL-6, son inductores de la síntesis de esta proteína, (148). Por otra parte, el AP aumenta los niveles de esta molécula de adhesión (149) lo que implica que en este sistema estudiamos dos moléculas que inducen la síntesis de E-selectina por lo que, aunque no estudiado en nuestro trabajo, podría explicar los resultados observados.

En concordancia con estos resultados, existe evidencia sobre el aumento de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 (150), MCP-1 (151) sCD40L (152) y siCAM-1 (153) en modelos de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). Adicionalmente, uno de los pocos reportes que evidencia la alteración en los niveles de E-selectina en aorta de ratas es en un modelo de diabetes. En este modelo, la infusión de insulina aumentó los niveles de E y P selectina en microvasos pulmonares (154). En el trabajo de esta tesis se pudo evidenciar una alteración en los niveles de estas moléculas marcadoras de inflamación y daño endotelial en respuesta a una dieta alta en grasa que indujo características SM. En base al efecto de Fasudil, sugerimos que el aumento en los niveles de estos mediadores podría estar dado en parte por la sobre-activación de la vía RhoA/ROCK, algo que está avalado por múltiples trabajos que demuestran la participación esta vía de señalización en la respuesta inflamatoria a nivel local y sistémico (155-158). En base a lo reportado cabe destacar que la inhibición farmacológica de RhoA/ROCK podría ser una interesante estrategia para el manejo de la inflamación presente en los sujetos con SM.

5.4 Metaloproteinasas

Las MMPs participan en múltiples procesos de daño cardiovascular: remodelación, inflamación, ruptura de placas ateroscleróticas y angiogénesis, entre otros (159). Adicionalmente, en pacientes diabéticos, hipertensos y obesos se ha identificado un aumento (por sobre el doble), en los niveles y actividad, de los miembros de la familia de metaloproteinasas 1, 2, 8 y 9 entre otras (160). Trabajos de la última década han reportado

un incremento en la actividad de proMMP9 en suero de pacientes sobre 40 años, diabéticos con SM (161) y elevados niveles de MMP2 en mujeres con SM no diabéticas sobre 50 años (162). En los sujetos evaluados en esta tesis en cambio, solo se induce un sutil aumento en la actividad de proMMP9 y MMP2 que no es significativamente diferente al observado en los sujetos sanos. Un estado leve de aumento de estas enzimas podría sugerir el inicio de un daño cardiovascular que pudiera progresar en conjunto a la severidad del SM.

Se ha reportado un aumento en la secreción de MMP9 cuando se estimulan células endoteliales con IL-6 a concentraciones superiores a las utilizadas en esta tesis (50000 veces más) por 24 h (163). En relación a insulina, existe un reporte clínico en el cual se realizaron infusiones de insulina a sujetos obesos observándose una disminución de la síntesis y actividad de la MMP9 en suero (164). Por otro lado, no hay evidencia sobre el efecto de AP en relación a las MMPs. Un estudio que utilizó otro ácido graso, como es el ácido linoleico, reporta un aumento en la actividad de MMP9 en el endotelio (165) por medio de la sobre activación de ERK.

En base a lo expuesto anteriormente los cambios en los niveles de MMPs observados en esta tesis, en los sobrenadante y los extractos intracelulares sugieren que se puedan deber a los efectos combinados de los tres estímulos por 24h.

Al igual que en los sujetos con SM evaluados en esta tesis, en el modelo de rata con SM no se vieron diferencias significativas en los niveles de actividad de MMPs en el suero, pero sí se observó un sutil aumento en la actividad de MMP2 en las aortas. En ratas inyectadas con LPS (166) y en experimentos *ex-vivo* con aortas calcificadas de animales viejos (167) también se ha observado un aumento de esta metaloproteinasa en la aorta. Estos trabajos también muestran un aumento dramático en los niveles de proMMP9 y MMP9 algo que no se observó bajo nuestras condiciones experimentales.

5.5 Estructura celular

Estudios *in-vitro* de IL-6 en células endoteliales en concentraciones supra-fisiológicas, inducen un reordenamiento de la monocapa endotelial y modifican el patrón uniones dependientes de la proteína ZO-1 junto con un aumento en la fosforilación de SRC (168-170). Por otra parte, la insulina produce remodelación y disminución de la síntesis de la actina, sobre activando la vía Akt a las 24h de estimulación. Estas alteraciones modifican el

trasporte trans-endotelial, la localización de caveolina-1 en el endotelio y la actividad de SRC en células musculares (171,172).

Puesto que no existen reportes del efecto del AP sobre la arquitectura de la células endoteliales, más allá de los reportados por esta tesis, nuestros hallazgos resultan relevantes ya que muestran que la IL-6, AP e insulina en conjunto, en concentraciones similares a las presentes en los sujetos con SM, inducen una alteración en la estructura de actina y de VE-caderina. Aunque no se estudió en esta tesis, estas observaciones sugieren modificaciones en la permeabilidad endotelial (173), lo que estaría relacionado con una alteración en la función endotelial.

A pesar de esto, en el modelo animal usado en esta tesis no se evidenciaron cambios estructurales significativos en las aortas teñidas con hematoxilina-eosina. Es necesario profundizar utilizando técnicas que permitan detectar alteraciones no visibles con la tinción realizada.

5.6 Alteraciones pro-trombóticas

La evidencia clínica y epidemiológica muestra que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de tromboembolismo arterial y venoso (TEV) (174,175) y específicamente, la obesidad abdominal se correlaciona con la incidencia de TEV (176). Se ha sugerido la participación de la vía de señalización de FT en la progresión de la obesidad y de la diabetes tipo 2 (177). En relación a esto, el grupo de sujetos jóvenes con SM evaluado en esta tesis mostró un estado leve de hiper-coagulabilidad evidenciado por un incremento en el plasma de ciertos parámetros de la cinética del potencial de generación de trombina, lo que agregaría una condición de riesgo para el desarrollo de complicaciones cardiovasculares. En concordancia con nuestros resultados, un estudio reciente muestra un incremento en el ETP en sujetos con sobrepeso pero sin SM, parámetro que empeora en individuos obesos (178). Es por esto que este leve estado de hiper-coagulabilidad presente en nuestro grupo de sujetos sería sugerente del principio de un desorden de hiper-coagulabilidad de mayor severidad, si las condiciones del SM progresan en estos individuos.

La ganancia de adherencia y pro-coagulabilidad es una característica fundamental del daño endotelial. Paradójicamente la IL-6 inhibe la liberación del contenido de los cuerpos

Weibel-Palade reduciendo los niveles de FVW extracelular (179). Por otra parte, en células beta-pancreáticas la insulina es un regulador positivo de la liberación de FVW (180). Por otro lado, no existe evidencia que reporte la liberación de FVW dada por la estimulación con AP, lo que destaca nuestro hallazgo.

El aumento en la liberación de FVW frente al conjunto de estímulos con efectos desiguales se podría explicar por la fuerza del efecto de AP e insulina por si solos, enmascarando la capacidad inhibitoria de IL-6.

El ensayo de adhesión plaquetaria a HUVEC en un modelo de incubación estático, permite evaluar la ganancia de adhesividad del endotelio. Sáez, y colaboradores han demostrado que en células endoteliales estimuladas con cocaína, aumenta de manera significativa el número de plaquetas que se adhieren al endotelio (181), a pesar de esto, no hay evidencia previa que muestre el efecto de IL-6, AP e insulina en la adhesión plaquetaria al endotelio. Resulta relevante destacar que Sáez, y colaboradores mostraron que la atorvastatina, un inhibidor no específico de RhoA/ROCK, evita este efecto. Esto avala los resultados, en los que se ha observado que la inhibición de la vía RhoA/ROCK con Y-27632 evita significativamente la adhesión de plaquetas al endotelio. Como proyección en base a los resultados de esta tesis, resultaría interesante realizar ensayos de adhesión en un sistema de flujo para conocer el efecto de esta variable en la adhesión plaquetaria en células endoteliales tratadas con IL-6, AP e insulina.

La APC se basa en la presencia de FT desde el endotelio (182). En células endoteliales la IL-6 actúa como agonista y potenciador de la liberación de FT soluble (183). Estudios que relacionen insulina y AP con la APC se limitan a estudios clínicos que han mostrado como la hiperinsulinemia y los ácidos grasos libres se relacionan de manera indirecta con un estado pro-coagulante mayor en sujetos diabéticos y obesos (184).

La internalización y almacenaje de lípidos en el endotelio es un área de estudio reciente. Uno de los trabajos que apoya los resultados obtenidos en esta tesis es el de Burgin-Maunders y colaboradores, que demostraron que la estimulación de HUVEC con ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) por 5 días produce gotas lipídicas en el citoplasma de las células, visualizado por tinción ORO (185). En los resultados de esta tesis, se muestra que el estímulo con las moléculas presentes en niveles elevados en los sujetos con SM produjo importantes cambios en el almacenamiento y contenido de lípidos

intracelulares, reflejados en un aumento en la densidad de dominios ricos en colesterol, mayor cantidad de gotas lipídicas y un incremento en el contenido de triglicéridos intracelulares. Resulta relevante destacar que la vía RhoA/ROCK en el endotelio es capaz de potenciar la internalización y tráfico intracelular de colesterol, en respuesta a ácido lisofosfatídico (LPA). La evidencia demuestra que la inhibición de esta vía inhibe este proceso (186). Los resultados de esta tesis mostraron que la inhibición de RhoA/ROCK evitó el aumento en el contenido graso intracelular, lo que sugiere la participación de esta vía en el proceso de interacción entre el endotelio y los lípidos. Por otro lado, además, la remodelación del citoesqueleto regulada por RhoA/ROCK es crucial en la adipogénesis. La activación de esta vía aumenta el contenido intracelular de triglicéridos en células madres derivadas de tejido adiposo (187) lo que podría relacionar la sobre activación de esta vía celular con el aumento en los niveles de lípidos intracelulares. Por otra parte, en ratones ApoE -/- se ha reportado un aumento en el infiltrado graso en la capa sub-endotelial, fenómeno similar al observado en esta tesis (188). En este mismo modelo de hipercolesterolemia se ha demostrado como los ácidos grasos insaturados son capaces de revertir la acumulación lipídica causada por el exceso de LDL circulante en la aorta (189). Los resultados de esta tesis reportan vez el efecto de una dieta alta en grasa sobre el almacenamiento lipídico en la aorta en animales no diabéticos ni hipertensos. Los resultados sugieren que lo observado se debe a un daño endotelial que aumenta la permeabilidad de la capa celular a los lípidos circulantes. Más aún, en base a los resultados obtenidos con la administración de Fasudil, postulamos que esta alteración es mediada en parte por la vía RhoA/ROCK y posiblemente por el efecto que tiene la droga sobre el consumo de grasa.

5.7 Otros marcadores encontrados en etapas subclínicas de SM

Ácido Palmítico

Cabe destacar, que en esta tesis se muestra que los sujetos con SM estudiados presentan elevados niveles plasmáticos de AP, que, en concentraciones patofisiológicas, produce importantes alteraciones en la función de las células endoteliales (38), hepatocitos (41) y adipocitos (190), promoviendo la respuesta pro-inflamatoria y pro-oxidativa. La principal fuente de este ácido graso es la dieta rica en aceites de origen animal, que en combinación a

un estilo de vida sedentario, reduce el proceso de metabolización del tejido adiposo (191). Estudios clínicos en sujetos de mediana edad (50 años) con SM y estudios *ex-vivo* han asociado los niveles elevados de AP con rigidez arterial (192), infartos (193) y resistencia a la insulina (194). A pesar de esto, a nuestro conocimiento este es el primer reporte que muestra niveles elevados de este ácido graso insaturado en un grupo de sujetos jóvenes con SM.

Resulta relevante destacar que una dieta rica en este ácido graso fue capaz de inducir en ratas alteraciones homologables a las presentes en los sujetos con SM, sugiriendo que una alta ingesta de este ácido graso saturado sería uno de los compuestos clave del cuadro patológico.

Ácido Úrico y Creatinina

Es necesario mencionar que en nuestro estudio, el análisis bioquímico de sujetos jóvenes con SM con las características anteriormente mencionadas, mostró niveles de ácido úrico elevados en comparación con sujetos sanos aunque aún dentro de rangos de normalidad. Niveles de ácido úrico elevados, ha sido previamente asociado a un estado pre-hipertensivo e insulino-resistente (195,196) y que podría ser un marcador de importancia en etapas subclínicas de un cuadro patológico.

En esta tesis, demostramos por primera vez que, *in-vitro*, las células endoteliales estimuladas con IL-6, AP e insulina liberan ácido úrico al medio. El ácido úrico ha sido utilizado como estímulo que genera DE (197), lo que demuestra su efecto nocivo para el endotelio. Considerando que el inhibidor de RhoA/ROCK redujo significativamente los niveles de ácido úrico, sugerimos que la sobre activación de la vía participaría en el proceso a nivel endotelial tal como ha sido reportado a nivel renal (198).

En el modelo animal de SM se observó un importante aumento del ácido úrico circulante, en conjunto con las sutiles alteraciones en la presión sistólica. Existe evidencia del aumento en los niveles de ácido úrico en modelos de ratas diabéticas (199), obesas inducidas por fructosa (200) y además se ha demostrado que esta molécula es capaz de inducir hipertensión sobre estimulando el eje renina-angiotensina e inhibiendo la síntesis de ON a nivel renal (201). Resultan interesantes las observaciones homologables entre lo que ocurre en el paciente, en el modelo animal e *in vitro*, en el que el endotelio pudiera estar participando en la producción y liberación de esta molécula.

Los sujetos con SM presentaron niveles disminuidos de creatinina plasmática en comparación a controles sanos, condición que ha sido propuesta como predictor de diabetes tipo 2 (202,203). Pese a que previamente se ha demostrado que sujetos adultos con SM presentaban disminución en los niveles de creatinina (204), en esta tesis identificamos esta alteración en una población mucho más joven que no presenta obesidad, diabetes o hipertensión.

A pesar de que en nuestro estudio *in-vitro* no evaluamos el efecto de la creatinina en las HUVEC, se ha reportado el rol protector de esta molécula en el daño endotelial inducido por estrés oxidativo y/o TNF- α (205), adicionalmente se ha demostrado que la Creatinina no tiene efectos dañinos sobre la proliferación y sobrevivencia de las células endoteliales (206), por lo que una disminución en sus niveles pudiera sugerir una pérdida en una capacidad protectora para el endotelio.

Resulta relevante destacar que las ratas con SM inducido por una dieta rica en AP presentaron reducidos niveles de creatinina plasmática, algo que ha sido previamente reportado en un modelo de rata con SM, específicamente hipertensa, hiper-triglicéridémica e hiper-insulinémica, inducida por una dieta alta en fructosa (207) avalando de manera indirecta nuestras observaciones.

En base a la evidencia anteriormente expuesta sugerimos que una disminución en los niveles plasmáticos de creatinina pudiera estar participando de manera indirecta en la DE, considerando que en las condiciones presentes en el SM habría una menor biodisponibilidad de esta molécula con capacidad protectoras para el endotelio.

5.7 Observaciones finales

La alta prevalencia del SM representa un problema serio de salud pública por ser una condición de mayor riesgo a desarrollar ECV, lo que tiene un alto impacto en la morbilidad, mortalidad y costos de tratamiento (208). En la actualidad hay un dramático aumento en los factores de riesgo cardiovasculares, como la dislipidemia y el sobrepeso, en la población adulto joven que se pueden iniciar de manera sutil y silente desde la niñez (209). En este contexto, nuestro estudio demostró que sujetos adultos jóvenes con SM pero sin diabetes tipo 2 o hipertensión ya muestran signos de alteraciones en el metabolismo glucídico,

dislipidemia, inflamación crónica y disfunción endotelial junto con una sobre activación de RhoA/ROCK.

Una de las fortalezas del estudio fue el mostrar como un grupo homogéneo de sujetos con sobrepeso, aparentemente sanos y sin tratamiento, presentando solo 3 criterios de diagnóstico ATPIII, ya tienen un grupo de factores de riesgo mencionados, lo que sienta las bases para el desarrollo de otras patologías. A pesar de que uno de las debilidades de este estudio fue el bajo número de sujetos reclutados, es importante destacar las diferencias observadas de los parámetros evaluados en comparación a controles sanos fueron altamente significativas.

In-vitro pudimos demostrar que tres componentes presentes en niveles elevados en sujetos con SM, que representan la inflamación, la dislipidemia y el desbalance glucídico, inducen DE por medio de la sobre activación de RhoA/ROCK.

La participación de RhoA/ROCK en el SM se apoya en parte por nuestro estudio *in-vivo*, en el que la dieta alta en grasa saturada indujo características de SM y un aumento en los marcadores de daño endotelial y de ECV, sin hipertensión o diabetes tipo 2. La inhibición de la vía no solo mejora los marcadores de inflamación, DE y ECV evaluados, sino que también revierte las características metabólicas relacionadas con el SM en los animales alimentados con dieta alta en grasa.

6. ACTIVIDADES Y LOGROS

Presentación a congresos:

- **Leguina-Ruzzi A***, Pereira-Flores K, Decap V, Pereira J, Velarde V, Sáez CG.. PALMITIC ACID, IL-6 AND INSULIN COMBINED INDUCE ENDOTHELIAL DAMAGE THAT IS REVERTED BY A RHOA/ROCK INHIBITOR XXVIII Annual Reunion Chilean Society of Physiological Science. Termas de Catillo, Chile September 24-27th 2013
- **Leguina-Ruzzi A***, Pereira-Flores K, Decap V, Pereira J, Velarde V, Sáez CG. PALMITIC ACID, IL-6 AND INSULIN COMBINED INDUCE ENDOTHELIAL DYSFUNCTION THROUGH RHOA/ROCK ACTIVATION 18th International Vascular Biology Meeting. Kyoto, Japon April 14-17th 2014
- **Leguina-Ruzzi A***. NEW PLASMATIC MARKERS OF METABOLIC SYNDROME IN YOUNG ADULTS: A POSSIBLE DIAGNOSIS OF AN EARLY ENDOTHELIAL DYSFUNCTION Young Investigator's Symposium, XVIII meeting of Clinical Chemistry. Santiago, Chile August 4-6th 2014
- **Leguina-Ruzzi. A***, Pereira-Flores K, Valderas JP, Acevedo M, Pereira J, Velarde V, Saez CG. MOLÉCULAS ELEVADAS EN SUJETOS JÓVENES CON SÍNDROME METABÓLICO: IL-6, INSULINA Y ÁCIDO PALMÍTICO, INDUCEN DISFUNCIÓN ENDOTELIAL A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE RHOA/ROCK. LI Chilean Meeting of Cardiology and Cardiovascular Surgery, Viña del Mar, Chile November 29- December 2nd 2014
- Saez CG*, **Leguina-Ruzzi A**, Pereira-Florez K, Valderas JP, Mezzano D, Velarde V, Pereira J. SIGNS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN YOUNG PATIENTS WITH METABOLIC SYNDROME: ASSOCIATION WITH RHOA/ROCK ACTIVATION. 59th Annual Meeting of Society of Thrombosis and Hemostasis Research. Dusseldorf, Germany, February 24-27th 2015.

- **Leguina-Ruzzi A**, Pereira J, Pereira-Flores K, Palominos M, Valderas JP, Acevedo M, Mezzano D, Velarde V, Sáez CG. Sujetos con síndrome metabólico, pre hipertensos y sin diabetes tipo 2 presentan signos de disfunción endotelial asociado a activación de RhoA/ROCK 1th Meeting of Society of Hypertension. Santiago, Chile, Septiembre 2-5th, 2015.
- **Leguina-Ruzzi A**, Peñaloza E, Pereira J, Alarcón C, Romero D, Roa JC, Mezzano D, Sáez CG, Velarde V. Studies on the role of RhoA-Rho kinase activation in an animal model of metabolic syndrome. XXX Annual Reunion Chilean Society of Physiological Science. Coquimbo, Chile September 22-25th 2015.

Becas:

- **Beca de apoyo para realización de tesis doctoral.** CONICYT, 2014
- **Beca "Encuentros Chile Global 2014" Jóvenes Líderes.** VRI 2014
- **Apoyo para la organización de seminarios y simposios por doctorantes.** VRI, 2014
- **Beca de apoyo a la investigación y tesis doctoral.** DRI Facultad de Medicina, Universidad Católica de Chile, 2014
- **Beca de asistencia a congreso.** VRI Pontificia Universidad Católica de Chile, 2014
- **Beca para doctorado nacional (tuición y mantención).** CONICYT, 2014

Publicación:

Leguina-Ruzzi A, Pereira J, Pereira-Flores K, Valderas JP, Mezzano D, Velarde V, Sáez CG. Increased RhoA/Rho kinase activity and markers of endothelial dysfunction in young adult subjects with metabolic syndrome. Metabolic Syndrome and Related Disorders (en proceso de publicación).

Docencia:

Supervisión de una práctica profesional y una unidad de investigación (estudiantes de Bioquímica) (2013-2014): Maria Paz Hernandez (Dra. Claudia Saez) y Estefanía Peñaloza (Dra. Victoria Velarde)

Participación académica programa PentaUC (2014-2015) (Marcelo Mobarec, director)

Participación Feria Científica EXPLORA (2014)

Evaluador proyectos XIX Concurso de Valoración y Divulgación de la Ciencia y la Tecnología del Programa EXPLORA CONICYT (2014)

Supervisor proyecto inmersión a la ciencia para alumno de Medicina (2015): Cecilia Alarcón (Dr. Jaime Pereira)

Ayudante curso Tópicos en Biología (2015) (Dra. Carolina Serrano, profesor a cargo)

Ayudante curso Microbiología Clínica (2015) (Dr. Bruno Tesser, profesor a cargo)

7. REFERENCIAS

1. BERNSTEIN MS, MORABIA A, SLOUTSKIS D: Definition and prevalence of sedentarism in an urban population. *Am J Public Health* 89: 862-867, 1999
2. DAS UN: Metabolic syndrome X: an inflammatory condition?. *Curr Hypertens Rep* 6:66-73, 2004
3. HAFFNER SM: The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 97(2A):3A-11, 2006
4. PISTAVOS C, PANAGIOSTAKOS D, WEINEM M, STEFANADIS C: Diet, Exercise and the Metabolic Syndrome. *The Review of Diabetic Studies* 3:118-126, 2006
5. ALBERTI KG, ECKEL RH, GRUNDY SM, ZIMMET PZ, CLEEMAN JI, DONATO KA, FRUCHART JC, JAMES WP, LORIA CM, SMITH SC JR; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE ON EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION; NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE; AMERICAN HEART ASSOCIATION; WORLD HEART FEDERATION; INTERNATIONAL ATHEROSCLEROSIS SOCIETY; INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY: Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16):1640-1645, 2009
6. GRUNDY SM: Metabolic Syndrome Pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 28: 629-636, 2008
7. MUJICA V, LEIVA E, ICAZA G, DIAZ N, ARREDONDO M, MOORE-CARRASCO R, ORREGO R, VÁSQUEZ M, PALOMO I: Evaluation of metabolic syndrome in adults of Talca city, Chile. *Nutr J* 15(7)14, 2008
8. POON VTW, KUK JL, ARDERN CI: Trajectories of metabolic syndrome development in young adults. *PLoSone* 9: e111647, 2014

9. MISRA A, WASIR JS, VIKRAM NK: Waist circumference criteria for the diagnosis of abdominal obesity are not applicable uniformly to all populations and ethnic groups. *Nutrition* 21(9): 969-976, 2005
10. RAVUSSIN E, SMITH SR: Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 967:363-378, 2002
11. Arcaro G, Zamboni M, Rossi L, Turcato E, Covi G, Armellini F, BOSELLO O, LECHI A: Body fat distribution predicts the degree of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:936-942, 1999
12. ALESSI MC, BASTELICA D, MORANGE P, BERTHET B, LEDUC I, VERDIER M, GEEL O, JUHAN-VAGUE I: Plasminogen activator inhibitor 1, trans- forming growth factor-beta1 and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 49:1374-1380, 2000
13. ZICCARDI P, NAPPO F, GIUGLIANO G, ESPOSITO K, MARFELLA R, CIOFFI M, D'ANDREA F, MOLINARI AM, GIUGLIANO D: Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 105:804-809, 2002
14. LACOSTE L, LAM J, HUNG J, LETCHACOVSKI G, SOLYMOSS C, WATERS D: Hyperlipidemia and Coronary Disease Correction of the Increased Thrombogenic Potential With Cholesterol Reduction. *Circulation* 92: 3172-3177, 1995
15. FREEDLAND ES: Role of a critical visceral adipose tissue threshold (CVATT) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond.)* 5:1-12, 2004
16. YANAI H, TOMONO Y, ITO K, FURUTANI N, YOSHIDA H, TADA N: The underlying mechanisms for development of hypertension in the metabolic syndrome. *Nutr J* 17: 7-10, 2008
17. ARONSON D: Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol* 45: 1-16, 2008

18. HAYDEN MR, TYAGI SC: Intimal redox stress: Accelerated atherosclerosis in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 27: 1-3, 2002
19. FULTON D: Mechanisms of Vascular Insulin Resistance: A Substitute Akt?. *Circ Res* 104:1035-1037, 2009
20. WEBER MA, SCHIFFRIN EL, WHITE WB, MANN S, LINDHOLM LH, KENERSON JG, FLACK JM, CARTER BL, MATERSON BJ, RAM CV, COHEN DL, CADET JC, JEAN-CHARLES RR, TALER S, KOUNTZ D, TOWNSEND R, CHALMERS J, RAMIREZ AJ, BAKRIS GL, WANG J, SCHUTTE AE, BISOGNANO JD, TOUYZ RM, SICA D, HARRAP SB: Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J Clin Hypertens* 1: 14-26, 2014
21. SCHILLACI G, PIRRO M, VAUDO G, GEMELLI F, MARCHESI S, PORCELLATI C, MANNARINO E: Prognostic value of the metabolic syndrome in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:1817-1822, 2004
22. KATAGIRI H, YAMADA T, OKA Y: Adiposity and cardiovascular disorders: disturbance of the regulatory system consisting of humoral and neuronal signals. *Circ Res* 101:27-39, 2007
23. GRASSI G, SERAVALLE G, CATTANEO BM, BOLLA GB, LANFRANCHI A, COLOMBO M, GIANNATTASIO C, BRUNANI A, CAVAGNINI F, MANCIA G: Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 25:560-563, 1995
24. SARAFIDIS PA, BAKRIS GL: Non-esterified fatty acids and blood pressure elevation: a mechanism for hypertension in subjects with obesity/insulin resistance? *J Hum Hypertens* 21:12-9, 2007
25. SECHI LA: Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension and their relationships with salt sensitivity. *J Hypertens* 17:1229-1237, 1999
26. ROCCHINI AP: Obesity hypertension, salt sensitivity and insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10:287-294, 2000

27. SARAFIDIS PA, BAKRIS GL: Insulin and endothelin: an interplay contributing to hypertension development? *J Clin Endocrinol Metab* 92:379-38, 2007
28. EGAN BM: Insulin resistance and the sympathetic nervous system. *Curr Hypertens Rep* 5:247-254, 2003
29. HUNG J, MCQUILLAN B, CHAPMAN C, THOMPSON P, BEILBY J: Elevated Interleukin-18 Levels Are associated With the Metabolic Syndrome Independent of Obesity and Insuline Resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1268-1273, 2005
30. WATT M, HOY A, MUOIO D, ROSALIND C: Distinct roles of specific fatty acids in celular procesess: implications for interpreting and reporting experiments. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1-E3, 2012
31. BEARE-ROGERS J, DIEFFENBACHER A, HOLM JV: Lexicon of lipid nutrition. *Pure Appl Chem* 4: 685-744, 2001
32. LESKINEN M, SOLAKIVI T, KUNNAS T, ALHO H, NIKKARI S: Serum fatty acids in postinfarction middle-aged men. *Scand J Clin Lab Invest* 65(6): 485-490, 2005
33. KIM, OY, LIM HH, LEE MJ, KIM JY, LEE JH: Association of fatty acid composition in serum phospholipids with metabolic síndrome and arterial stiffness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23(4): 366-374, 2013
34. SUN SW, SU XY, TOU Q, CHEN LX, LI K, TANG CK, LIAO DF: Cafeolae and caveolin-1 mediate endocytosis and transcytosis of oxidized low density lipoprotein in endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin* 31(10): 1336-1342, 2010
35. SPRENGER R, FONTIJN R, MARLE JV, PANNEKOEK H, HORREVOETS A: Special segregation of transport and signalling functions between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes. *Biochem J* 400(3): 401-410, 2006
36. CACICEDO J, KEANEY JF, NEAIL JR, RUDERMAN N, IDO Y: Activation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) prevents Palmitate-induced increases in oxidative stress and apoptosis. *ADA Abstract*, 1997-P, 2005

37. HOLTHE MR, ANDERSSON Y, LYBERG T: Lack of proinflammatory effects of free acids on human umbilical cord vein endothelial cells and leukocytes. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84: 672-678, 2005
38. MALONEY E, SWEET I, HOCKENBERY D, PHAM M, RIZZO N, TATEYA S, HANDA P, SCHWARTZ MW, KIM F: Activation of NF-KB by Palmitate in Endothelial Cells: a key role for NADPH Oxidase-Derived superoxide in response to TLR4 Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1370-1375, 2009
39. NILSSON L, BANFI C, DICZFALUSY U, TREMOLI E, HAMSTEN A, ERIKSSON P: Unsaturated fatty acids increase plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1679-1685
40. WANG XL, ZHANG L, YOUKER K, ZHANG MX, WANG J, LEMAIRE SA, COSELLI JS, SHEN YH: Free fatty acids inhibit insulin signaling-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation through up regulating PTEN or inhibiting Akt Kinase. *Diabetes* 55: 2301-2310, 2006
41. PAN Z, WANG J, TANG H, LI L, LV J, XIA L, HAN C, XU F, HE H, XU H, KANG B: Effects of palmitic acid on lipid metabolism homeostasis and apoptosis in goose primary hepatocytes. *Mol Cell Biochem.* 350:39-46, 2011
42. KISHIMOTO T: Interleukin-6: from basic science to medicine— 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23:1, 2005
43. MIHARA M, HASHIZUME, YOSHIDA H, SUZUKI M, SHIINA M: IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 122: 143-159, 2012
44. HIBI M, MURAKAMI M, SAITO M, HIRANO T, TAGA T, KISHIMOTO, T: Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63: 1149–1157, 1990
45. HEINRUCH P, BEHRMANN, HAAN S, HERMANN S, MULLER-NEUEN G, SCHAPER F: Principles of interleukin (IL)-6-type signalling and its regulation. *Biochem J* 374: 1-20, 2011
46. TANG XL, JIANG ZY, DONG J, LIU XC, CAI SY, XIAO R, LU YR: Expression of tissue factor induced by IL-6 in HUVEC. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 37: 234-237, 2006

47. KISHIMOTO T: IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 22: 347-352, 2010
48. LANGENBERG C, BERGSTROM J, SCHEIDT-NAVE C, PFEILSCHIFTER J, BARRETT-CONNOR E: Cardiovascular death and the metabolic syndrome: role of adiposity-signaling hormones and inflammatory markers. *Diabetes Care* 29: 1363-1369, 2006
49. WILCOX G: Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 26: 19-39, 2005
50. REAVEN G: The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am* 33:283-303, 2004
51. HSU IR, KIM SP, KABIR M, BERGMAN RN: Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and cancer. *Am J Clin Nutr* 86(3): 867-871
52. AMERY CM, NATTRASS M: Fatty acids and insulin secretion. *Diabetes Obes Metab* 2: 213-21, 2000
53. ZENG G, NYSTROM FH, RAVICHANDRAN LV, CONG LN, KIRBY M, MOSTOWSKI H, QUON MJ: Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101(13):1539-45, 2001
54. ZENG G, QUON MJ: Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 98:894-898, 1996
55. WU H, JIANG C, GAN D, LIAO Y, REN H, SUN Z, ZHANG M, XU G: Different effects of low- and high-dose insulin on ROS production and VEGF expression in bovine retinal microvascular endothelial cells in the presence of high glucose. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249(9):1303-1310, 2011
56. BERENGUER M, MARTINEZ L, GIORGETTI-PERALDI S, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, GOVERS R: A serum factor induces insulin-independent translocation of GLUT4 to the cell surface which is maintained in insulin resistance. *PLoS One* 20;5(12):e15560, 2010

57. ARAGONÈS G, SAAVEDRA P, HERAS M, CABRÉ A, GIRONA J, MASANA L: Fatty acid-binding protein 4 impairs the insulin-dependent nitric oxide pathway in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol* 18(11):72, 2012
58. ANDREOZZI F, LARATTA E, PROCOPIO C, HRIBAL ML, SCIACQUA A, PERTICONE M, MIELE C, PERTICONE F, SESTI G: Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biol* 27:2372-2383, 2007
59. JIAN X, MING-HIU X: Molecular Insights and Therapeutic Targets for Diabetic Endothelial Dysfunction. *Circulation* 13:1266-1286, 2009
60. MOMBOULI JV, VANHOUTTE P: Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Moll Cell Cardiol* 31: 61-74, 1999
61. CHEN B, LU Y, CHEN Y, CHENG G: The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries. *J Endocrinol* 225(3): R83-99, 2015
62. TARGONSKI PV, BONETTI PO, PUMPER GM, HIGANO ST, HOLMES DR JR, LERMAN A: Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation*. 107: 2805–2809, 2003
63. BRAVETTI G, SCHIANO V, CHIARIELLO M: Endothelial dysfunction: A key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease?. *Atherosclerosis* 197: 1-11, 2008
64. HAGHJOOYEJAVANMARD S, NEMATBAKHS M: Endothelial function and dysfunction: clinical significance and assessment. *J Res Med Sci*. 13: 207-221, 2008
65. CHEN Y, WANG S, LU X, ZHANG H, FU Y, LUO Y: Cholesterol sequestration by nystatin enhances the uptake and activity of endostatin in endothelium via regulating distinct endocytic pathways. *Blood* 6392-403, 2011
66. YAO L, ROMERO MJ, TOQUE H, YANG G, CALDWELL R, CALDWELL W: The role of RhoA/ROCK kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res* 4: 165-170, 2010
67. THOMPSON AM, ZHANG Y, TONG W, XU T, CHEN J, ZHAO L, KELLY TN, CHEN CS, BAZZANO LA, HE J: Association of inflammation and endothelial

- dysfunction with metabolic syndrome, prediabetes and diabetes in adults from Inner Mongolia, China. *BMC Endocr Disord* 11:16, 2011
68. LU Y, LI H, JIAN W, ZHUANG J, WANG K, PENG W, XU Y: The Rho/Rho-associated protein kinase inhibitor fasudil in the protection of endothelial cells against advanced glycation end products through the nuclear factor κ B pathway. *Exp Ther Med* 6:310-316, 2013
 69. RIENTO K, RIDLEY AJ: Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 446-456, 2003
 70. LEUNG T, MANSER E, TAN L, LIM L: A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to Peripherals membranes. *J Biol Chem* 270: 29051-29054, 1995
 71. NUNES KP, RIGSBY CS, WEBB RC: RhoA/Rho-Kinase and vascular diseases: What is the link?. *Cell Mol Life Sci* 67: 3823-3826, 2010
 72. GRASSIE ME, MOFFAT LD, WALSH MP, MACDONALD JA: The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1 δ . *Arch Biochem Biophys* 510:147-159, 2011
 73. AMANO M, NAKAYAMA M, KAIBUCHI K: Rho-kinase/ROCK: a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 67(9): 545-554, 2010
 74. LOIRAND G, HUERIN P, PACAUD P: Rho kinase in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 98: 322-334, 2006
 75. ROMERO MJ, PLATT DH, TAWFIK HE, LABAZI M, EL-REMESSY AB, BARTOLI M: Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res* 102: 95-102, 2008
 76. SAEZ CG, PEREIRA-FLORES K, MENDOZA C, OCARANZA MP, JALIL JE, MASSARDO T, MEZZANO D, PALLAVICINI J, IBAÑEZ C, VELIZ J, EBENSBERGER R, PEREIRA J: Rho-A kinase activation in endothelial cells is induced by cocaine or plasma from cocaine consumers: association with a prothrombotic phenotype and effect of the inhibitors atorvastatin and Y-27632. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013 Scientific Sessions, May 1-3, 2013, Lake Buena Vista, FL, USA.

77. OCARANZA MP, RIVERA P, NOVOA U, PINTO M, GONZÁLEZ L, CHIONG M, LAVANDERO S, JALIL JE: Rho kinase inhibition activates the homologous angiotensin-converting enzyme-angiotensin-(1-9) axis in experimental hypertension. *J Hypertens* 29:706-15, 2011
78. KANDA T, WAKINO S, HOMMA K, YOSHIOKA K, TATEMATSU S, HASEGAWA K, TAKAMATSU I, SUGANO N, HAYASHI K, SARUTA T: Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension. *FASEB J* 20: 169-171, 2006
79. NAIK JS, XIANG L, HESTER RL: Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290:R154-61, 2006
80. LIU PY, CHEN JH, LIN LJ, LIAO JK: Increased Rho Kinase activity in a Taiwanese population with Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 49: 1619-1624, 2007
81. SCHINZARI F, TESAURO M, ROVELLA V, DI DANIELE N, GENTILESCHI P, MORES N, CAMPIA U, CARDILLO C: Rho-kinase inhibition improves vasodilator responsiveness during hyperinsulinemia in the metabolic síndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E806-E811, 2012
82. FUJIOKA J: Metabolic syndrome treatment strategies. *Pharmacotherapy* 12: 222S-226S, 2006
83. LAUFS U, LIAO JK: Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273: 24266 – 24271, 1998
84. NOHRIA A, GRUNERT ME, RIKITAKE I, NOMA K, PRSIC A, GANZ P, LIAO JK, CREAGER MA: Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease. *Circ Res* 99: 1426- 1432, 2006
85. WU DJ, XU JZ, WU YJ, JEAN-CHARLES L, XIAO B, GAO PJ, ZHU DL: Effects of fasudil on early atherosclerotic plaque formation and established lesion progression in apolipoprotein E-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 207:68-73, 2009

86. MA Z, ZHANG J, DU R, JI E, CHU L: Rho kinase inhibition by fasudil has anti-inflammatory effects in hypercholesterolemic rats. *Biol Pharm Bull.* 34:1684-9, 2011
87. MCGOWN CC1, BROWN NJ, HELLEWELL PG, BROOKES ZL: ROCK induced inflammation of the microcirculation during endotoxemia mediated by nitric oxide synthase. *Microvasc Res* 81:281-8, 2011
88. QUIROGA T, GOYCOOLEA M, GIESEN PL, MORALES M, MUÑOZ B, ARANDA E, RODRÍGUEZ S, PANES O, MARTÍNEZ C, PEREIRA J, MEZZANO D: Thrombin generation in platelet-poor plasma is normal in patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages. *Pathophysiol Heamost Thromb* 33: 30-35, 2003
89. LÓPEZ LM, LEYTON C, GRAF ME: Técnicas de histología y citología. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Escuela de Tecnología Médica. Segunda Edición, 1982
90. GRUNDY SM, CLEEMAN JI, RANIELS SR, DONAT KA, ECKEL RH, FRANKLIN BA, GORDON DJ, KRAUSS RM, SAVAGE PJ, SMITH SC, SPERTUS JA, COSTA F, AMERICAN HEART ASSOCIATION, NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE: Diagnosis and management of Metabolic Syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112: 285-290, 2005
91. DEANFIELD JE, HALCOX JO, RABELINK TJ: Endothelial function and dysfunction. *Circulation* 115: 1285-1295, 2007
92. STENVINKEL P: Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link?. *Nephrol Dial Transplant* 16(10): 1968-1971, 2001
93. LOIRAND G, GUÉRIN P, PACAUD P: Rho Kinase in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 98: 322-334, 2006
94. GABRIELLI L, WINTER JL, GODOY I, MCNAB P, PADILLA I, CORDOVA S, RIGOTTI P, NOVOA U, MORA I, GARCÍA L, OCARANZA MP, JALIL JE. Increased rho-kinase activity in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Am J Hypertens* 27: 838-845, 2014

95. KITANO K, USUI S, OOTSUJI H, TAKASHIMA S, KOBAYASHI D, MURAI H, FURUSHO H, NOMURA A, KANEKO S, TAKAMURA M: Rho-kinase activation in leukocytes plays a pivotal role in myocardial ischemia/reperfusion injury. *PlosOne* DOI: 10.1371/journal.pone.0092242, 2014
96. LIN MT, LIN BR, CHANG CC, CHU CY, SU HJ, CHEN ST, JENG YM, KUO ML: IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. *Int J Cancer* 120(12): 2600-2608, 2007
97. LIU X, YAN F, YAO H, CHANG M, QIN J, LI Y, WANG Y, PIE X: Involvement of RhoA/ROCK in insulin secretion of pancreatic β -cell in 3D culture. *Cell Tissue Res* 358(2): 359-369, 2014
98. HUNG MJ, CHERNG WJ, HUNG MY, WU HT, PANG JH: Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. *J Hypertens* 28(5): 940-951, 2010
99. LO CW, CHEN MW, HSIAO M, WANG S, CHEN CA, HSIAO SM, CHANG JS, LAI TC, ROSE-JOHN S, KUO ML, WEI LH: IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer. *Cancer Res* 71(2): 424-434
100. HERMANN C, ASSMUS B, URBICH C, ZEIHNER AM, DIMMELER S: Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signaling cascade for endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(2): 402-409
101. WERNER H1, CHANTELAU EA: Differences in bioactivity between human insulin and insulin analogues approved for therapeutic use- compilation of reports from the past 20 years. *Diabetol Metab Syndr* 3(1):13. doi: 10.1186/1758-5996-3-13
102. MAVRIA G1, VERCOULEN Y, YEO M, PATERSON H, KARASARIDES M, MARAIS R, BIRD D, MARSHALL CJ: ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell* 9(1):33-44, 2006
103. LI H, UNG CY, MA XH, LI BW, LOW BC, CAO ZW, CHEN YZ: Simulation of crosstalk between small GTPase RhoA and EGFR-ERK signaling pathway via

- MEKK1. Simulation of crosstalk between small GTPase RhoA and EGFR-ERK signaling pathway via MEKK1. *Bioinformatics* 25(3):358-364, 2009
104. XI Y, WEI Y, SENNINO B, ULSAMER A, KWAN I, BRUMWELL AN, TAN K, AGHI MK, MCDONALD DM, JABLONS DM, CHAPMAN HA: Identification of pY654- β -catenin as a critical co-factor in hypoxia-inducible factor-1 α signaling and tumor responses to hypoxia. *Oncogen* 32(42):5048-5057, 2013
 105. SEN B, JOHNSON FM: Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct* doi: 10.1155/2011/865819, 2011
 106. MATSUOKA T, YASHIRO M: Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 20(38):13756-13766, 2014
 107. LEVE F, MARCONDES TG, BASTOS LG, RABELLO SV, TANAKA MN, MORGADO-DÍAZ JA: Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells. *Eur J Pharmacol* 671(1-3):7-17, 2011
 108. HUVENEERS S, DANEN EH: Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* 22(Pt 8):1059-1069, 2009
 109. CICEK FA, KANDILCI HB, TURAN B: Role of ROCK upregulation in endothelial and smooth muscle vascular functions in diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol* 12:51. doi: 10.1186/1475-2840-12-51, 2013
 110. ARITA R, HATA Y, NAKAO S, KITA T, MIURA M, KAWAHARA S, ZANDI S, ALMULKI L, TAYYARI F, SHIMOKAWA H, HAFEZI-MOGHADAM A, ISHIBASHI T: Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* 58(1):215-26, 2009
 111. TOUATI S, MEZIRI F, DEVAUX S, BERTHELOT A, TOUYZ RM, LAURANT P: Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc* 43(3):398-407, 2011
 112. ZHAO Z, LUO Z, WANG P, SUN J, YU H, CAO T, NI Y, CHEN J, YAN Z, LIU D, ZHU Z: Rosiglitazone Restores Endothelial Dysfunction in a Rat Model of Metabolic Syndrome through PPAR γ - and PPAR δ -Dependent Phosphorylation of Akt and eNOS. *PPAR Res* doi: 10.1155/2011/291656, 2011

113. KLOK MD, JAKOBSDOTTIR S, DRENT ML: The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8(1):21-34, 2007
114. LE DRÉAN G, HAURE-MIRANDE V, FERRIER L, BONNET C, HULIN P, DE COPPET P, SEGAIN JP: Visceral adipose tissue and leptin increase colonic epithelial tight junction permeability via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *FASEB J* 28(3):1059-1070, 2014
115. LI Z, LIANG J, WU WK, YU X, YU J, WENG X, SHEN J: Leptin activates RhoA/ROCK pathway to induce cytoskeleton remodeling in nucleus pulposus cells. *Int J Mol Sci* 15(1):1176-1188, 2014
116. ZEIDAN A, JAVADOV S, CHAKRABARTI S, KARMAZYN M: Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. *Cardiovasc Res* 77(1):64-72, 2008
117. ÁLVAREZ-CASTRO P, PENA L, CORDIDO F: Ghrelin in obesity, physiological and pharmacological considerations. *Mini Rev Med Chem* 13(4):541-52, 2013
118. ALIPOUR MR, ALMASI S, KEYHANMANESH R, ALIPARASTI MR, ANSARIN K, FEIZI H: Effect of exogenous ghrelin on heme oxygenase and ROCK isoforms gene expression in the lung of chronic hypoxic Wistar rats. *Gen Endoc* doi: 10.4183/aeb.2012.5, 2012
119. HIGASHI Y, NOMA K, YOSHIKUMI M, KIHARI Y: Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular disease. *Circ J* 73: 411-418, 2009
120. CAIMI G, LO PRESTI R, MONTANA M, NOTO D, CANINO B, AVERNA MR, HOPPS E: Lipid Peroxidation, Nitric Oxide metabolites and their ration in a group of subjects with Metabolic Syndrome. *Oxid Med Cell Longev* doi: 10.1155/2014/824756, 2014
121. HUNG MJ, CHERNG WJ, HUNG MY, WU HT, PANG JH: Interleukin-6 inhibits endothelial nitric oxide synthase activation and increases endothelial nitric oxide synthase binding to stabilized caveolin-1 in human vascular endothelial cells. *J Hypertens* 28(5):940-951, 2010

122. KIM F, TYSSELING KA, RICE J, PHAM M, HAJI L, GALLIS BM, BAAS AS, PARAMSOTHY P, GIACHELLI CM, CORSON MA, RAINES EW: Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5):989-994, 2005
123. FISSALTHALER B, BENZING T, BUSSE R, FLEMING I: Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide* 8(4):253-61, 2003
124. MING XF, VISWAMBHARAN H, BARANDIER C, RUFFIEUX J, KAIBUCHI K, RUSCONI S, YANG Z: Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 22(24):8467-8477, 2002
125. RIKITAKE Y, LIAO JK: Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 97(12):1232-1235, 2005
126. HUNTER JC, ZEIDAN A, JAVADOV S, KILIĆ A, RAJAPUROHITAM V, KARMAZYN M: Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced neonatal cardiomyocyte hypertrophy via a RhoA-ROCK-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol* 47(6):810-818, 2009
127. MARUHASHI T, NOMA K, IWAMOTO Y, IWAMOTO A, ODA N, KAJIKAWA M, MATSUMOTO T, HIDAKA T, KIHARA Y, CHAYAMA K, NAKASHIMA A, GOTO C, LIAO JK, HIGASHI Y: Critical role of exogenous nitric oxide in ROCK activity in vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0109017, 2014
128. LIU C, ZUO J, JANSSEN LJ: Regulation of airway smooth muscle RhoA/ROCK activities by cholinergic and bronchodilator stimuli. *Eur Respir J* 28(4):703-711, 2006
129. WASSMANN S, STUMPF M, STREHLOW K, SCHMID A, SCHIEFFER B, BÖHM M, NICKENIG G: Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 94(4):534-541, 2004
130. LU Y, QIAN L, ZHANG Q, CHEN B, GUI L, HUANG D, CHEN G, CHEN L: Palmitate induces apoptosis in mouse aortic endothelial cells and endothelial

- dysfunction in mice fed high-calorie and high-cholesterol diets. *Life Sci* 92(24-26):1165-1173, 2013
131. URUNO A, FURUSAWA Y, YAGISHITA Y, FUKUTOMI T, MURAMATSU H, NEGISHI T, SUGAWARA A, KENSLER TW, YAMAMOTO M: The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol Cell Biol* 33(15):2996-3010, 2013
 132. CICEK FA, KANDILCI HB, TURAN B: Role of ROCK upregulation in endothelial and smooth muscle vascular functions in diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol* doi: 10.1186/1475-2840-12-51, 2013
 133. BAYLIS C, MITRUKA B, DENG A: Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90(1):278-281, 1992
 134. WIND S, BEUERLEIN K, ARMITAGE ME, TAYE A, KUMAR AH, JANOWITZ D, NEFF C, SHAH AM, WINGLER K, SCHMIDT HH: Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension* 56(3):490-497, 2013
 135. PALM F, BUERK DG, CARLSSON PO, HANSELL P, LISS P: Reduced nitric oxide concentration in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on renal oxygenation and microcirculation. *Diabetes* 54(11):3282-3287, 2005
 136. WANG Y, ZHANG Z, SUN W, TAN Y, LIU Y, ZHENG Y, LIU Q, CAI L, SUN J: Sulforaphane attenuation of type 2 diabetes-induced aortic damage was associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *Oxid Med Cell Longev* doi: 10.1155/2014/123963, 2014
 137. AMINZADEH MA, REISMAN SA, VAZIRI ND, SHELKOVNIKOV S, FARZANEH SH, KHAZAELI M, MEYER CJ: The synthetic triterpenoid RTA dh404 (CDDO-dhTFEA) restores endothelial function impaired by reduced Nrf2 activity in chronic kidney disease. *Redox Biol* doi: 10.1016/j.redox.2013.10.007, 2013

138. ERDEI N, TÓTH A, PÁSZTOR ET, PAPP Z, EDES I, KOLLER A, BAGI Z: High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(5):H2107-2115, 2006
139. HOU N, HAN F, WANG M, HUANG N, ZHAO J, LIU X, SUN X: Perirenal fat associated with microalbuminuria in obese rats. *Int Urol Nephrol* 46(4):839-845, 2014
140. AIT-OUFELLA H, TALEB S, MALLAT Z, TEDGUI A: Recent Advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 969-979, 2011
141. MARIN V, MONTERO-JULIAN FA, GRÈS S, BOULAY V, BONGRAND P, FARNARIER C, KAPLANSKI G: The IL-6-soluble IL-6R α autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol* 167(6):3435-3442
142. MALONEY E, SWEET IR, HOCKENBERY DM, PHAM M, RIZZO NO, TATEYA S, HANDA P, SCHWARTZ MW, KIM F: Activation of NF- κ B by Palmitate in Endothelial Cells: A Key Role for NADPH Oxidase-Derived Superoxide in Response to TLR4 Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(9): 1370–1375, 2009
143. ALJADA A, GHANIM H, SAADEH R, DANDONA P: Insulin inhibits NF κ B and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86(1):450-453, 2001
144. HASHIMOTO M, SHINGU M, EZAKI I, NOBUNAGA M, MINAMIHARA M, KATO K, SUMIOKI H: Production of soluble ICAM-1 from human endothelial cells induced by IL-1 beta and TNF-alpha. *Inflammation* 18(2):163-173, 1994
145. BARNES TC, ANDERSON ME, MOOTS RJ: The many faces of interleukin-6: the role of IL-6 in inflammation, vasculopathy, and fibrosis in systemic sclerosis. *Int J Rheumatol* doi: 10.1155/2011/721608, 2011
146. SANADGOL N, MOSTAFAIE A, MANSOURI K, BAHRAMI G: Effect of palmitic acid and linoleic acid on expression of ICAM-1 and VCAM-1 in human bone marrow endothelial cells (HBMECs). *Arch Med Sci* 8(2): 192–198, 2012

147. RAHMAN A, KEFER J, BANDO M, NILES WD, MALIK AB: E-selectin expression in human endothelial cells by TNF- α -induced oxidant generation and NF- κ B activation. *Am J Physiol* 275(3 Pt 1):L533-544, 1998
148. CHIU JJ, CHEN LJ, LEE CI, LEE PL, LEE DY, TSAI MC, LIN CW, USAMI S, CHIEN S: Mechanisms of induction of endothelial cell E-selectin expression by smooth muscle cells and its inhibition by shear stress. *Blood* 110(2):519-528, 2007
149. REISSIG D, RASSOUL F, SALVETTER J, WAGNER O, RICHTER V: Effect of fatty acids on expression of endothelial leukocyte adhesion molecules. *Eur J Nutr* 42(4):224-227, 2003
150. GERGERLIOGLU H, DEMIR E, ALP M, OZ M: Effects of Quercetin in IL-6 and TNF- α Levels in Diabetic Rats. *FASEB Journal* 29(1): S1, 2015
151. MARISA C, LUCCI I, DI GIULIO C, BIANCHI G, GRILLI A, PATRUNO A, REALE M: MCP-1 and MIP-2 expression and production in BB diabetic rat: effect of chronic hypoxia. *Mol Cell Biochem* 276(1-2):105-111, 2005
152. WANG XH, DING XM, LI Y, LIU HB, XUE WJ, TIAN XH, FENG XS, JIAO FM, ZHENG J: Simultaneous blockade of the CD40/CD40L and NF- κ B pathways prolonged islet allograft survival. *Transpl Int* 25(1):118-126, 2012
153. WANG LJ, YU YH, ZHANG LG, WANG Y, NIU N, LI Q, GUO LM: Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats: correlated with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas. *Eur J Pharmacol* 597(1-3):75-80, 2008
154. MARTINS JO, CAMPOS CA, CRUZ JW, MANZOLLI S, ALVES VA, VIANNA EO, JANCAR S, SANNOMIYA P: Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. *BMC Pulm Med* doi: 10.1186/1471-2466-10-39, 2010
155. XIE X, PENG J, CHANG X, HUANG K, HUANG J, WANG S, SHEN X, LIU P, HUANG H: Activation of RhoA/ROCK regulates NF- κ B signaling pathway in experimental diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol* 369(1-2):86-97, 2013
156. SEGAIN JP, RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE D, SAUZEAU V, BOURREILLE A, HILARET G, CARIO-TOUMANIANTZ C, PACAUD P, GALMICHE JP, LOIRAND G: Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor

- kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 124(5):1180-1187, 2003
157. NAKAYAMA Y, KOMURO R, YAMAMOTO A, MIYATA Y, TANAKA M, MATSUDA M, FUKUHARA A, SHIMOMURA I: RhoA induces expression of inflammatory cytokine in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 379(2):288-292, 2009
 158. MA DW, WANG QY, MA XY, LI J, GUAN QH, FU Y: The effect of fasudil via Rho/ROCK signaling pathway on the inflammation and fibrosis in human mesangial cells in high glucose medium. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 50(7):580-584, 2011
 159. TZIAKAS DN, LAZARIDES MK, TENTES IK, GEORGIADIS GS, ELEFThERIADOU E, CHALIKIAS GK, KORTASARIS A, HATSERAS DI: Gelatinases [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9] induce carotid plaque instability but their systemic levels are not predictive of local events. *Ann Vasc Surg* 19: 529-533, 2005
 160. HOPPS E, CAIMI G: Matrix Metalloproteinases in Metabolic Syndrome. *Eur J Intern Med* 2: 99-104, 2012
 161. GONCALVES FM, JACOB-FERREIRA ALB, GOMES VA, CASELLA-FILHO A, CHAGAS ACP, MARCACCINI AM, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE: Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9 and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 403: 173-177, 2009
 162. MIKSZTOWICZ V, MUZZIO ML, ROYER M, PRADA M, WIKINSKI R, SCRHRER L, BERG G: Increased plasma activity of metalloproteinase 2 in women with metabolic syndrome. *Metabolism* 57: 1493-1496, 2008
 163. YAO JS, ZHAI W, YOUNG WL, YANG GY: Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: the role for KDR and MMP-9. *Biochem Biophys Res Commun* 342(4):1396-1404, 2006
 164. DANDONA P, ALJADA A, MOHANTY P, GHANIM H, BANDYOPADHYAY A, CHAUDHURI A: Insulin suppresses plasma concentration of vascular

- endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9. *Diabetes Care* 26(12):3310-3314, 2003
165. MENA J, MANOSALVA C, RAMIREZ R, CHANDIA L, CARROZA D, LOAIZA A, BURGOS RA, HIDALGO MA: Linoleic acid increases adhesion, chemotaxis, granule release, intracellular calcium mobilisation, MAPK phosphorylation and gene expression in bovine neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 151(3-4):275-284, 2013
 166. CUI N, WANG H, LONG Y, SU L, LIU D: Dexamethasone Suppressed LPS-Induced Matrix Metalloproteinase and Its Effect on Endothelial Glycocalyx Shedding. *Mediators Inflamm* doi: 10.1155/2015/912726, 2015
 167. QIN X, CORRIERE MA, MATRISIAN LM, GUZMAN RJ: Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(7):1510-1516, 2006
 168. DESAI TR, LEEPER NJ, HYNES KL, GEWERTZ BL: Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. *J Surg Res* 104(2):118-123, 2002
 169. MARUO N, MORITA I, SHIRAO M, MUROTA S: IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* 131(2):710-714, 1992
 170. HUANG YH, YANG HY, HSU YF, CHIU PT, OU G, HSU MJ: Src contributes to IL6-induced vascular endothelial growth factor-C expression in lymphatic endothelial cells. *Angiogenesis* 17(2):407-418, 2014
 171. WANG H, WANG AX, BARRETT EJ: Insulin-induced endothelial cell cortical actin filament remodeling: a requirement for trans-endothelial insulin transport. *Mol Endocrinol* 26(8):1327-1338, 2012
 172. ROSENZWEIG T, AGA-MIZRACHI S, BAK A, SAMPSON SR: Src tyrosine kinase regulates insulin-induced activation of protein kinase C (PKC) delta in skeletal muscle. *Cell Signal* 16(11):1299-1308, 2004
 173. SIDIBÉ A, IMHOF BA: VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. *Nat Immunol* 5(3):215-217, 2014
 174. STEIN PD, BEEMATH A, OLSON RE: Obesity as a risk factor in venous thromboembolism (VTE). *Am J Med* 118: 978-980, 2005

175. MORANGE PE, ALESSI MC: Thrombosis in central obesity and metabolic syndrome: Mechanisms and epidemiology. *Thromb Haemost* 110: 669-680, 2013
176. VAYÁ A, MARTÍNEZ-TRIGUERO ML, ESPAÑA F, TODOLÍ JA, BONET E, CORELLA D: The metabolic syndrome and its individual components: its association with venous thromboembolism in a Mediterranean population. *Metab Syndr Relat Disord*; 9: 197-201, 2011
177. RUF W, SAMAD F: Tissue factor pathways linking obesity and inflammation. *Hamostaseologie* 35: Epub ahead of print, 2015
178. CAMPELLO E, ZABEO E, RADU CM, SPIEZIA L, GAVASSO S, FADIN M, WOODHAMS B, VETTOR R, SIMIONI P: Hypercoagulability in overweight and obese subjects who are asymptomatic for thrombotic events. *Thromb Haemost* 113: 85-96, 2015
179. BERNARDO A, BALL C, NOLASCO L, MOAKE JF, DONG JF: Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood* 104(1):100-106, 2004
180. NIGHTINGALE T, CUTLER D: The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J Thromb Haemost* S1:192-201, 2013
181. SÁEZ CG, PEREIRA-FLORES K, EBENSPERGER R, PANES O, MASSARDO T, HIDALGO P, MEZZANO D, PEREIRA J: Atorvastatin reduces the proadhesive and prothrombotic endothelial cell phenotype induced by cocaine and plasma from cocaine consumers in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(11):2439-2448, 2014
182. GUPTA M, DOELLGAST GJ, CHENG T, LEWIS JC: Expression and localization of tissue factor-based procoagulant activity (PCA) in pigeon monocyte-derived macrophages. *Thromb Haemost* 70(6):963-969, 1993
183. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U: Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 96(12):1233-1239, 2005

184. HENDRICH S: (n-3) Fatty Acids: Clinical Trials in People with Type 2 Diabetes. *Adv Nutr* 1(1):3-7, 2010
185. Bürgin-Maunder CS, Brooks PR, Russell FD: Omega-3 fatty acids modulate Weibel-Palade body degranulation and actin cytoskeleton rearrangement in PMA-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Mar Drugs* 11(11):4435-4450, 2013
186. STIRLING L, WILLIAMS MR, MORIELLI AD: Dual roles for RHOA/RHO-kinase in the regulated trafficking of a voltage-sensitive potassium channel. *Mol Biol Cell* 20(12):2991-3002, 2009
187. SCHILLER ZA, SCHIELE NR, SIMS JK, LEE K, KUO CK: Adipogenesis of adipose-derived stem cells may be regulated via the cytoskeleton at physiological oxygen levels in vitro. *Stem Cell Res Ther* 4(4):79, 2013
188. FURUHASHI M, TUNCMAN G, GÖRGÜN CZ, MAKOWSKI L, ATSUMI G, VAILLANCOURT E, KONO K, BABAEV VR, FAZIO S, LINTON MF, SULSKY R, ROBL JA, PARKER RA, HOTAMISLIGIL GS: Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447(7147):959-965, 2007
189. DUPASQUIER CM, DIBROV E, KNEESH AL, CHEUNG PK, LEE KG, ALEXANDER HK, YEGANEH BK, MOGHADASIAN MH, PIERCE GN: Dietary flaxseed inhibits atherosclerosis in the LDL receptor-deficient mouse in part through antiproliferative and anti-inflammatory actions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(4):H2394-402, 2007
190. MADSEN L, PETERSEN RK, KRISTIANSEN K: Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 1740(2):266-286, 2005
191. KIEN CL, BUNN JY, UGRASBUL F: Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 82: 320-326, 2005
192. KIM OY, LIM HH, LEE MJ, KIM JY, LEE JH: Association of fatty acid composition in serum phospholipids with metabolic syndrome and arterial stiffness. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 23: 366-374: 2013

193. WIBERD B, SUNDSTROM J, ARNOLV J, TERENT A, VESSBY B, ZETHELIUS B, LIND L: Metabolic risk factors for stroke and transient ischemic attack in middle-aged men. *Stroke* 37: 2898-2903, 2006
194. REYNOSO R, SALGADO LM, CALDERÓN V: High Levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin substrate-1. *Mol Cell Biochem* 246: 155-162, 2003
195. SYAMALA S, LI J, SHANKAR A: Association between serum uric acid and prehypertension among US adults. *J Hypertens* 25: 1583-1589, 2007
196. PETRIE JL, PATMAN GL, SINHA I, ALEXANDER TD, REEVES HL, AGIUS L: The rate of production of uric acid by hepatocytes is a sensitive index of compromised cell ATP homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: 1255-1265, 2013
197. Kanellis J, Kang DH: Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease. *Semin Nephrol* 1740(2):266-286, 2005
198. KOLAVENNU V, ZENG L, PENG H, WANG Y, DANESH FR: Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control. *Diabetes* 57(3):714-723, 2008
199. PADIYA R, KHATUA TN, BAGUL PK, KUNCHA M, BANERJEE SK: Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. *Nutr Metab (Lond)* doi: 10.1186/1743-7075-8-53, 2011
200. JOHNSON RJ, NAKAGAWA T, SANCHEZ-LOZADA G, SHAFIU M, SUNDARAM S, LE M, ISHIMOTO T, SUATIN YY, LANASPA MA: A Role for Uric Acid in Fructose-induced Fat Accumulation. *Diabetes* 62(10): 3307-3315, 2013
201. MAZZALI M, HUGHES J, KIM YG, JEFFERSON JA, KANG DH, GORDON KL, LAN HY, KIVLIGHN S, JOHNSON RJ: Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 38(5): 1101-1106, 2001
202. HJELMESAETH J, ROISLIEN J, NORDSTRAND N, HOFSDO D, HAGER H, HARTMANN A: Low serum creatinine is associated with type 2 diabetes in

- morbidly obese women and men: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord* 2010; 10:6
203. HARITA N, HAYASHI T, SATO KK, NAKAMURA Y, YONEDA T, ENDO G, KAMBE H: Lower serum creatinine is a new risk factor of type 2 diabetes: the Kansai healthcare study. *Diabetes Care* 2009; 32: 424-426
 204. TANAKA H, SHIOHIRA Y, UEZU Y, HIGA A, ISEKI K: Metabolic syndrome and chronic kidney disease in Okinawa, Japan. *Kidney Int* 69(2):369-374, 2006
 205. NOMURA A, ZHANG M, SAKAMOTO T, ISHII Y, MORISHIMA Y, MOCHIZUKI M, KIMURA T, UCHIDA Y, SEKIZAWA K: Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol* 139(4):715-720, 2003
 206. DOU L, BERTRAND E, CERINI C, FAURE V, SAMPOL J, VANHOLDER R, BERLAND Y, BRUNET P: The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 65(2):442-451, 2004
 207. DIMO T, RAKOTONIRINA A, TAN PV, DONGO E, DONGMO AB, KAMTCHOUING P, AZAY J, ABEGAZ BM, CROS G, NGADJUI TB: Antihypertensive effects of *Dorstenia psilurus* extract in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. *Phytomedicine* 8(2):101-106, 2001
 208. Zimmet P, Magliano D, Matsuzawa Y, Alberti G, Shaw J: The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12(6):295-300, 2005
 209. JESSUP A, HARRELL H: The Metabolic Syndrome: Look for It in Children and Adolescents, Too!. *Clin Diabetes* 23(1): 26-32, 2005