

## El ejercicio aeróbico moderado evita la disfunción endotelial y neuronal producida por una dieta rica en grasas en arteria mesentérica de rata

Aerobic exercise training avoids endothelial and neuronal dysfunction produced by a high fat diet in rat mesenteric artery

Sastre E \*, Caracuel L \*, Balfagón G, Blanco-Rivero J

\* Sastre E y Caracuel L han contribuido igualmente en la realización de este trabajo y ambas han de ser consideradas primer autor del mismo. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid; Instituto de Investigación La Paz (IdIPAZ), Madrid, España.

### Resumen

**Objetivo:** Determinar si la obesidad inducida por una dieta rica en grasa (HFD) está asociada con modificaciones en las funciones endotelial o neuronal, y los efectos del entrenamiento aeróbico moderado en estos cambios.

**Materiales y métodos:** Se utilizaron: (i) ratas control (dieta estándar); (ii) ratas alimentadas con una dieta HFD durante ocho semanas, y (iii) ratas HFD sometidas a un entrenamiento aeróbico moderado. Se analizaron las respuestas vasomotoras a acetilcolina (ACh) y estimulación eléctrica (EE), el efecto de L-NAME sobre dichas respuestas, la respuesta vasodilatadora al donante de óxido nítrico (NO) DEA-NO, las liberaciones de NO y de O<sub>2</sub>- y la expresión de nNOS y eNOS.

**Resultados:** La ingesta de la dieta HFD disminuyó la respuesta vasodilatadora a ACh e incrementó la respuesta vasoconstrictora a EE. El efecto del L-NAME fue menor en ambos casos en ratas HFD. Las liberaciones de NO endotelial y neuronal fueron disminuidas en ratas HFD. La liberación de O<sub>2</sub>- solo aumentó en arterias de ratas HFD con endotelio. La vasodilatación a DEA-NO disminuyó sólo en arterias HFD con endotelio. HFD no modificó la expresión de eNOS, pero disminuyó la expresión de nNOS. Todos estos cambios fueron evitados por el entrenamiento aeróbico moderado.

**Conclusión:** La práctica de ejercicio aeróbico moderado evitó la disfunción de la inervación nitrérgica perivascular y endotelial inducidas por una dieta HFD, evitando el desarrollo de mecanismos que favorecen la hipertensión.

### Palabras clave:

Obesidad inducida por dieta, entrenamiento aeróbico moderado, función endotelial, inervación perivascular nitrérgica, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno.

### Abstract

**Objective:** We investigated whether high-fat diet (HFD)-induced obesity was associated with modifications on endothelial or innervation functions, and the possible effects of aerobic exercise training on these changes.

**Methods:** (i) Control rats (standard diet); (ii) rats fed a HFD for 8 weeks; and (iii) HFD rats submitted to an aerobic exercise training were used. Vasomotor responses to acetylcholine (ACh) and electric field stimulation (EFS), the effect of L-NAME in these responses, vasomotor responses to nitric oxide (NO) donor DEA-NO, NO and O<sub>2</sub>- releases, and nNOS and eNOS expression were analysed.

**Results:** HFD decreased ACh vasodilatation and increased EFS-induced contraction. The effect of L-NAME was lower in both cases in HFD segments. Both endothelial and neuronal NO releases were decreased in HFD. O<sub>2</sub>- release was augmented only in endothelium-intact HFD arteries. DEA-NO was decreased only in endothelium-intact segments from HFD. HFD decreased nNOS and did not modify eNOS expressions. All the modifications described were avoided after training.

**Conclusion:** Aerobic exercise training avoided endothelial and nitregeric innervation dysfunction induced by a HFD, thus avoiding the development of mechanisms which lead to hypertension.

### Key words:

Obesity, nitric oxide, aerobic training, endothelium, perivascular innervation.

### Correspondencia

Dr. Javier Blanco Rivero  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid. C/ Arzobispo Morcillo 4. 28029 Madrid  
e-mail: javier.blanco@uam.es

## Introducción

Es bien conocido que la obesidad es un importante problema de salud ya que entre otras alteraciones favorece el desarrollo de hipertensión. La combinación de obesidad e hipertensión está asociada con altas tasas de morbilidad y mortalidad debidas, en gran medida, a alteraciones del sistema cardiovascular [1]. Dependiendo de la cantidad y del tipo de ácidos grasos contenidos en una dieta hipercalórica que induce la obesidad, se regulan complejas señales intracelulares que modulan diversas funciones que participan en el mantenimiento del tono vascular y, por lo tanto, de la presión arterial [2].

La pared arterial está formada por tres capas concéntricas: túnica íntima, compuesta por células endoteliales; túnica media, formada por células musculares lisas; y túnica adventicia, compuesta por tejido conjuntivo, además de terminaciones nerviosas que liberan distintos neurotransmisores. El tono arterial está regulado, entre otros, por la inervación perivascular y factores endoteliales. Tanto el endotelio como la inervación nitrérgica perivascular producen y liberan el vasodilatador óxido nítrico (NO) que se sintetiza a partir de la eNOS y la nNOS, respectivamente. Se ha descrito que la obesidad está asociada a un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), incrementando el metabolismo del NO [3], mientras que el ejercicio físico previene el daño oxidativo mediante un incremento de mecanismos antioxidantes [4-9], aumentando la biodisponibilidad del NO. Consecuentemente, la disminución en la síntesis y/o biodisponibilidad de NO de origen endotelial y/o neuronal aumenta la resistencia vascular periférica y, por lo tanto, participa en el desarrollo de hipertensión.

Se ha demostrado que el consumo crónico de una dieta hipercalórica rica en grasas produce obesidad y disfunción endotelial por disminución en la liberación de NO [1, 10-12], así como incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno ROS [13]. Previamente hemos demostrado que una dieta rica en grasas produce aumento de la respuesta vasoconstrictora a EE debido en parte a la disminución de la síntesis de NO asociada a una disminución en la expresión de la nNOS. Adicionalmente, hemos observado que el ejercicio moderado disminuye la formación de ROS en la arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas [13-16].

Teniendo en cuenta los datos anteriormente expuestos, nuestro objetivo fue analizar si en animales alimentados durante un corto periodo de tiempo, con dieta hipercalórica rica en grasa, la práctica de ejercicio aeróbico moderado impide la disminución de la liberación de NO de origen en-

dotelial y/o neuronal, así como el aumento de su metabolismo, lo cual disminuiría el riesgo de desarrollo de hipertensión a largo plazo.

## Materiales y métodos

Los procedimientos experimentales llevados a cabo en los animales fueron aprobados por el Comité de la Universidad Autónoma de Madrid y de acuerdo con las directrices para el cuidado ético de los animales experimentales según la legislación española y europea comunitaria (RD 223/88 MAPA y 609/86). Los resultados se presentan de acuerdo a las directrices usadas para experimentos con animales (McGrath *et al.*, 2010).

El experimento se realizó con ratas macho de tres meses de edad de colonias Wistar, que fueron mantenidas a una temperatura constante, humedad y ciclo de luz (12-12 horas de luz-oscuridad) con acceso libre a agua y comida. Los animales se dividieron en tres grupos: 1) ratas control, 2) ratas obesas, alimentadas con una dieta rica en grasas (HFD, 35% de grasa), y 3) ratas HFD sometidas a un protocolo de entrenamiento aeróbico moderado.

### Protocolo de entrenamiento

El ejercicio se llevó a cabo en una cinta rodante impulsada por un motor LI8706 (Letica Scientific Instruments, Barcelona, España) durante un periodo de ocho semanas (dos semanas de adaptación; seis semanas de entrenamiento), cinco veces por semana con duración de 50 minutos/día. La intensidad del ejercicio se realizó al 55-65% (15-20 m/min) de la velocidad de carrera máxima [17]. La intensidad se obtuvo a partir de la determinación de la capacidad de ejercicio máximo, ya que fueron sometidas a una prueba de ejercicio progresivo, en la cinta descrita anteriormente, mediante un protocolo de velocidad incremental de 5 m/min cada tres minutos hasta el agotamiento. Se consideró que una rata estaba agotada cuando ya no podía correr en la cinta de entrenamiento. La prueba se repitió después de cinco semanas con el fin de ajustar la intensidad.

### Mantenimiento de tejidos

24 horas después de la última sesión de entrenamiento, las ratas fueron sacrificadas por inhalación de CO<sub>2</sub> y posterior decapitación. El músculo sóleo fue extraído y almacenado a -80° C para ser utilizado posteriormente en el análisis de la citrato sintasa. La arteria mesentérica fue extraída, limpiada del tejido conectivo y grasa, dividida en segmentos (2 mm) y conservada en solución Krebs-Henseleit en frío (4° C) (KHS) (115 mmol/L de NaCl, 25 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 mmol/L de KCl, 1,2 mmol/L de Mg-

SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,5 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mmol/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,1 mmol/L de glucosa y 0,01 mmol/L de Na<sub>2</sub>EDTA).

#### Actividad citrato sintasa

La actividad citrato sintasa, marcador de la actividad oxidativa del músculo, se determinó en el sóleo derecho de los animales de acuerdo con el método descrito por Alp y cols. [18]. La actividad de la enzima se midió en homogeneizados de músculo entero, y el complejo resultante a partir de acetil-CoA y oxalacetato se determinó a 412 nm y 25° C, en un intervalo de 10 minutos. La actividad citrato sintasa se expresa como nmol/min por mg de proteína.

#### Reactividad vascular

Se llevó a cabo el método utilizado por Nielsen y Owman [19]. Se utilizaron dos alambres paralelos que se introdujeron a través de la luz del segmento de arteria mesentérica: uno de los dos alambres se encuentra fijo a la pared de baño, mientras que el otro tiene movilidad y está conectado a un transductor de fuerza (Grass FTO3C; Quincy, Massachusetts, USA), que a su vez está conectado a un polígrafo (Grass, modelo 7D) donde se registran los cambios de tensión. Para llevar a cabo la estimulación eléctrica (EE), los segmentos se colocaron entre dos electrodos de platino separados 0,5 cm y conectados a un estimulador (Grass, modelo S44) encargado de suministrar la intensidad de corriente adecuada.

Los segmentos fueron introducidos en un baño de órganos que contenía 5 ml de KHS a 37° C burbujeado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), proporcionando un pH de 7.4. El experimento contó con segmentos que presentaban endotelio y segmentos sin endotelio, de los cuales fue eliminado mediante frotación suave de la superficie luminal de cada segmento.

Los segmentos fueron sometidos a una tensión de 0,5 g, que se reajustó cada 15 minutos, durante un periodo aproximado de 90 minutos. Después, las arterias fueron expuestas a 75 mmol/L de KCl, con el fin de analizar la integridad funcional. Fueron descartados aquellos segmentos que indujeron una respuesta contráctil inferior a 0,5 g. Posteriormente, después de un periodo de lavado, se comprobó la presencia de endotelio, mediante la capacidad de la acetilcolina (ACh, 10 μmol/L) para producir la relajación de los segmentos precontraídos con NA (1 μmol/L).

Para estudiar la influencia de la obesidad y el entrenamiento sobre el efecto vasodilatador del NO endotelial, se analizó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh (0,1 nmol/L- 10 μmol/L) en arterias mesentéricas con endotelio

de ambos grupos experimentales. Para estudiar la contribución del NO endotelial en la respuesta vasodilatadora a ACh, se realizaron curvas de relajación a ACh (0,1 nM- 10 μM) en presencia de N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 0,1 mmol/L).

Para determinar posibles modificaciones en la participación de la inervación perivascular mesentérica debidas a la obesidad y al entrenamiento, se realizaron las curvas de frecuencia-respuesta (1, 2, 4, 8 y 16 Hz) a estimulación eléctrica con los parámetros de 200 mA, 0,3 mseg, durante 30 segundos con intervalo de un minuto entre estímulos para la recuperación del tono basal. Se realizaron tres curvas consecutivas con un periodo de lavado de al menos una hora para evitar la desensibilización entre las mismas, mostrando respuestas similares. Las curvas se realizaron en arterias con y sin endotelio. Para analizar la participación de la inervación nitrérgica en la respuesta a estimulación eléctrica se añadió al baño L-NAME (0,1 mmol/L), 30 min antes de realizar la curva de frecuencia-respuesta.

La respuesta vasodilatadora producida por el donante de óxido nítrico, dietilamina NONOato (DEA-NO; 0,1 nmol/L- 0,1 μmol/L), fue medida en arterias con y sin endotelio precontraídas con noradrenalina.

#### Medición de óxido nítrico

El óxido nítrico se midió mediante fluorescencia emitida por una sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), como se ha descrito anteriormente [15, 20]. Segmentos de arteria mesentérica con y sin endotelio de cada animal (control, HFD y HFD entrenada) fueron sometidos a un periodo de equilibrado en tampón HEPES (119 mmol/L NaCl; 20 mmol/L de HEPES; 1,2 mmol/L de CaCl<sub>2</sub>; 4,6 mmol/L de KCl; 1 mmol/L de MgSO<sub>4</sub>; 0,4 mmol/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 mmol/L de NaHCO<sub>3</sub>; 5,5 mmol/L de glucosa; 0,15 mmol/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) durante 60 minutos a 37° C. Las arterias se incubaron con 2 μmol/L de DAF-2 durante 30 minutos. Seguidamente, el medio fue recogido para medir la liberación de óxido nítrico basal. Una vez que el baño fue rellenado, se realizó la curva concentración-respuesta a ACh o curvas dependientes de frecuencia a EE. Después, se recogió el medio para llevar a cabo la medición de la liberación de óxido nítrico inducida por EE. La fluorescencia se midió a temperatura ambiente usando un espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS50 Instrumentos; FL WINLAB de *software*, de Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con longitud de onda de excitación a 492 nm y longitud de onda de emisión a 515 nm. La liberación de óxido nítrico inducida por EE se calcula restando la liberación basal del mismo a partir de la evocada por EE.

Además, se realizaron medidas de muestra en blanco a partir del medio, con el fin de descartar la emisión de fondo. La cantidad de NO se expresó en unidades arbitrarias/mg de tejido.

### Western Blot

Los experimentos de expresión de proteínas se realizaron siguiendo protocolos descritos previamente [15, 20]. Se utilizaron anticuerpos policlonales contra eNOS o contra nNOS (ambos a 1:2000, Abcam, UK) y anticuerpo secundario específico anti-IgG de conejo conjugado con actividad peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), diluido 1:2000. El experimento se reveló mediante el empleo de un *kit* ECL™, siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Se utilizaron células endoteliales y homogenados de cerebro de rata como control positivo. La misma membrana se utilizó para determinar la expresión de  $\beta$ -actina, utilizada para corregir la expresión de cada muestra ( $\beta$ -actina (1:50000, Sigma-Aldrich, Spain). Las bandas fueron analizadas utilizando el *software* Scion Image (Scion Corporation).

### Aniones superóxido

Para medir los niveles de aniones superóxido se utilizó la técnica de quimioluminiscencia emitida por lucigenina [15]. Los segmentos de arteria mesentérica se sometieron a un periodo de equilibrado en tampón HEPES a 37°C y posteriormente fueron transferidos a tubos de ensayo que contenían 1 ml de tampón HEPES con lucigenina (5 mmol/L) a 37°C y pH 7,4. Después, se utilizó el luminómetro y se llevaron a cabo mediciones repetidas durante cinco minutos a intervalos de 10 segundos. Finalmente, se adicionó 4,5-dihidroxi-1,3-benceno disulfónico «Tirón», que es el encargado de eliminar los aniones superóxido producidos por quimioluminiscencia. Los cálculos se obtuvieron realizando la resta entre lo obtenido en presencia y ausencia de «Tirón». También se recogieron medidas del blanco, en ausencia de segmentos de arteria, para determinar la emisión de fondo.

### Fármacos usados

Los fármacos utilizados en este experimento son L-noradrenalina clorhidrato (NA), acetilcolina clorhidrato, N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), dietil amina NO-NOato amónico, 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las soluciones madre (10 mmol/L) de los fármacos utilizados se realizaron con agua destilada, a excepción de la noradrenalina que se di-

solvió en NaCl (0,9%) - solución ácido ascórbico (0,01% p/v). Estas soluciones se mantuvieron a -20°C y las soluciones fueron elaboradas en KHS el día del experimento, mantenidas a 4°C.

### Análisis de datos

Las respuestas producidas por estimulación eléctrica y noradrenalina se expresaron como un porcentaje de la contracción inicial obtenida tras la exposición a 75 nmol/L de KCl para comparar las respuestas obtenidas en los tres grupos experimentales. Las relajaciones inducidas por ACh o por DEA-NO se expresaron como un porcentaje de la contracción inicial producida por noradrenalina (control: 995 + 45.1 mg; HFD: 987.4 + 35.4 mg; HFD entrenadas: 998.2 + 75.2 mg  $P > 0,05$ ). Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  E.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante la comparación de la curva obtenida en presencia de las diferentes sustancias por medio de ANOVA de dos vías, seguidos por la prueba post-hoc de Bonferroni, utilizando el software Graphpad Prism 5.0 (San Diego, California, EE.UU.). Para el NO y los aniones superóxido, el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguida por el test post-hoc de Newman-Keuls.  $P < 0,05$  fue considerado significativo.

## I Resultados

### Evolución de los animales

El incremento de peso corporal fue significativamente mayor en animales sedentarios alimentados con una dieta HFD, y disminuyó en ratas HFD entrenadas [Control: 88.1 + 8.4 g (n=12); HFD sedentarias: 164.2 + 9.8 g\* (n=16); HFD entrenadas: 125.6 + 7.4 g\*# (n=15); \* $P < 0.05$  vs control; #  $P < 0.05$  vs HFD sedentarias]. La ingesta diaria de comida fue significativamente menor en ratas HFD sedentarias comparadas con los controles durante todo el procedimiento experimental. El entrenamiento no modificó la ingesta de comida en ratas HFD [Control: 21.6 + 0.2 g (n=12); HFD sedentarias: 18.5 + 0.4 g\* (n=16); HFD entrenadas: 16.2 + 0.3 g\* (n=15); \* $P < 0.05$  vs control]. La ingesta calórica diaria fue significativamente mayor en ratas HFD sedentarias comparadas con los controles durante todo el procedimiento experimental. El entrenamiento no modificó la ingesta calórica en ratas HFD [Control: 64.8 + 0.6 KCal (n=12); HFD sedentarias: 99.2 + 2.2 KCal\* (n=16); HFD entrenadas: 87.5.2 + 1.6 g\* (n=15); \* $P < 0.05$  vs control]. La actividad citrato sintasa en sóleo fue significativamente mayor en HFD entrenadas en comparación con las HFD sedentarias (HFD seden-

tarias: 48.9 + 1.0 nmol/min mg proteína; HFD entrenadas: 69.0 + 4.2 nmol/min mg proteína\*; n= 10 animales cada grupo).

### Respuesta vasoconstrictora a KCl

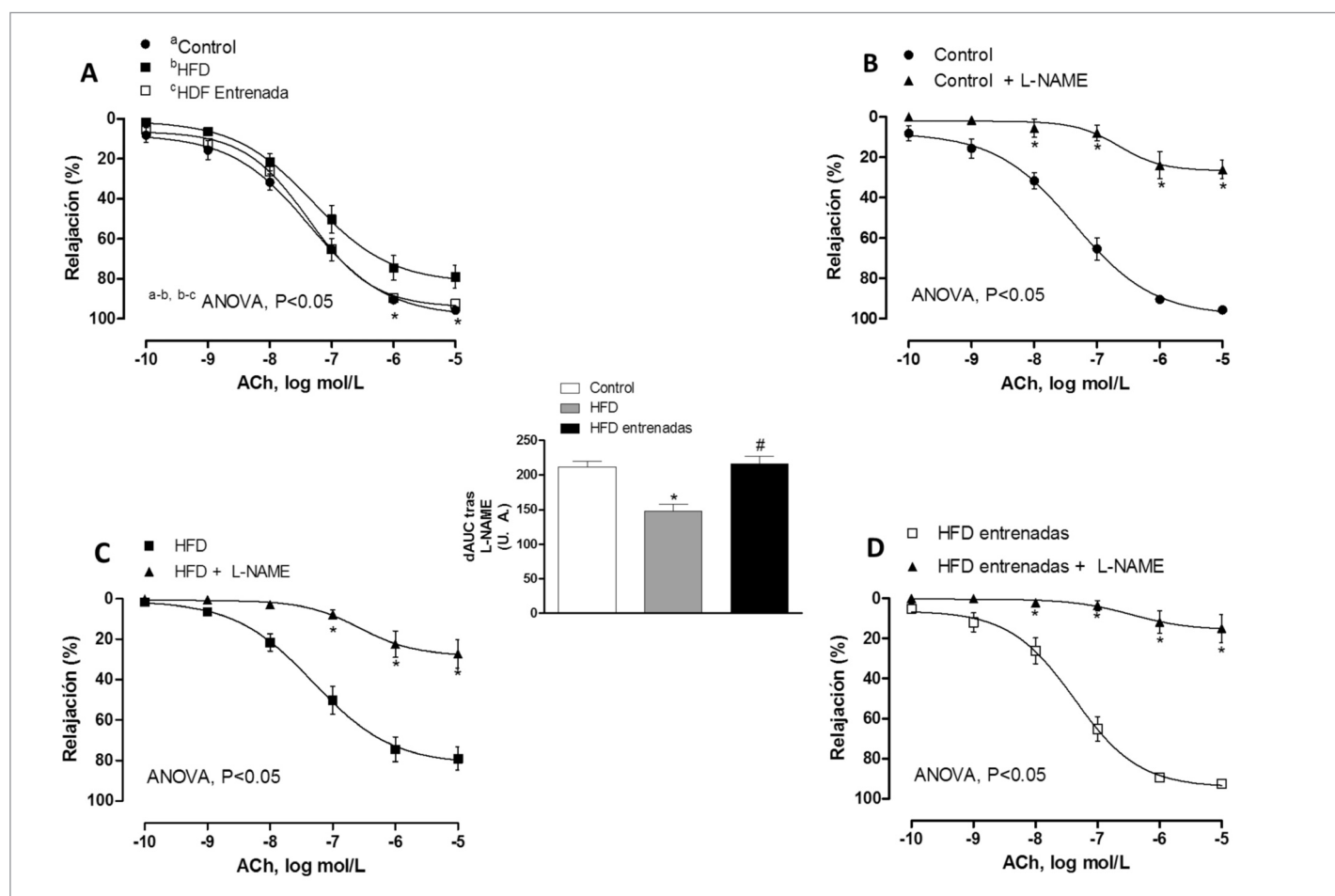
La respuesta vasoconstrictora a KCl fue similar en los tres grupos experimentales [Control: 1772+ 123 mg (n=12); HFD sedentarias: 1797 + 121 mg (n=16); HFD entrenadas: 1699 + 112 mg (n=15)] y no fue modificada por la eliminación de endotelio [Control: 1848+ 81 mg (n=12); HFD sedentarias: 1968 + 100 mg (n=16); HFD entrenadas: 1852+ 80 mg (n=15)].

### Efecto de la ingesta de la dieta HFD y el entrenamiento sobre el NO de origen endotelial

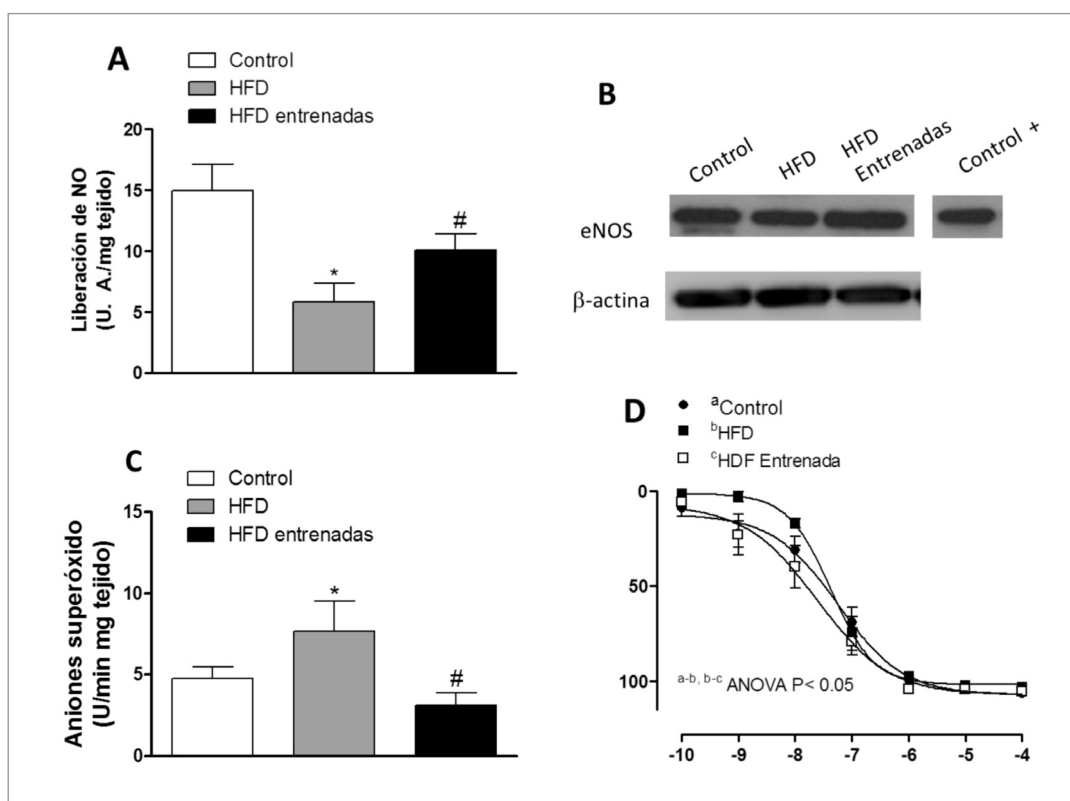
En segmentos precontraídos con NA, la aplicación de ACh produjo una respuesta dependiente de dosis que fue

menor en animales HFD sedentarios en comparación con los controles (Figura 1A), y que no se vio modificada en animales HFD entrenados (Figura 1A). La preincubación con el inhibidor no específico de la NO sintasa L-NAME (0.1 mmol/L) redujo la respuesta vasodilatadora a ACh en segmentos de los tres grupos experimentales, pero en menor medida en segmentos de ratas HFD sedentarias (Figuras 1B, 1C y 1D).

La liberación de NO inducida por ACh fue menor en ratas HFD sedentarias en comparación con ratas control y HFD entrenadas (Figura 2A). La expresión de eNOS fue similar en segmentos de los tres grupos experimentales (Figura 2B). La producción de  $O_2^-$  fue mayor en segmentos de animales HFD sedentarios en comparación con animales control y HFD entrenados. (Figura 2C). La respuesta vasodilatadora al donante de NO DEA-NO fue menor en ratas HFD sedentarias (Figura 2D).



**Fig. 1.** Respuesta vasodilatadora a ACh en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas (A). Efecto de la preincubación con L-NAME sobre la respuesta vasodilatadora a ACh en segmentos de ratas control (A), HFD (B) y HFD entrenadas (C). n= 8 animales por grupo experimental. \* P< 0.05 vs. situación sin fármaco. La gráfica insertada muestra las diferencias de área bajo la curva en presencia/ausencia de L-NAME. n= 8 animales por grupo experimental. \*P< 0.05 vs. Control. # P< 0.05 vs. HFD.



**Fig. 2.** (A) Liberación de NO inducida por ACh en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas. n= 6-8 ratas por grupo experimental. \*P< 0.05 vs. Control. # P< 0.05 vs. HFD. (B) Imagen representativa de la expresión de eNOS en homogenados de arteria mesentérica de ratas control, HFD y HFD entrenadas. n= 4 animales por grupo experimental. (C) Producción de aniones superóxido en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas. n= 6-8 ratas por grupo experimental. \*P< 0.05 vs. Control. # P< 0.05 vs. HFD. (D) Respuesta vasodilatadora a DEA-NO en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas- n= 8 animales por grupo experimental.

### Efecto de la ingesta de la dieta HFD y el entrenamiento sobre el NO de origen neuronal

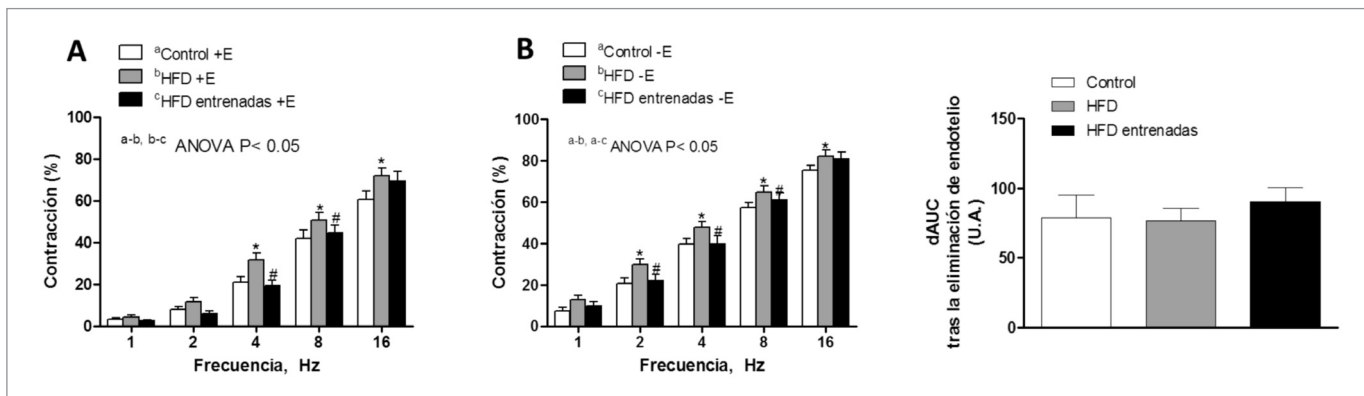
La aplicación de EE indujo una respuesta contráctil dependiente de frecuencia en segmentos de los tres grupos experimentales. Esta vasoconstricción fue mayor en segmentos de ratas HFD sedentarias en comparación con segmentos de ratas control y HFD entrenadas (Figura 3A). La vasoconstricción inducida por EE fue prácticamente abolida por el bloqueante de la propagación del impulso nervioso TTX (0.1 μmol/L), indicando el origen neuronal de esta respuesta vasoconstrictora (resultados no mostrados). La eliminación del endotelio incrementó la respuesta vasoconstrictora a EE de manera similar en los tres grupos experimentales (Figuras 3B y 3C).

La preincubación con el inhibidor no específico de la NOS L-NAME (0.1 mmol/L) incrementó de manera significativa la respuesta contráctil inducida por EE en segmentos de ratas control y HFD entrenadas, pero no la modificó en seg-

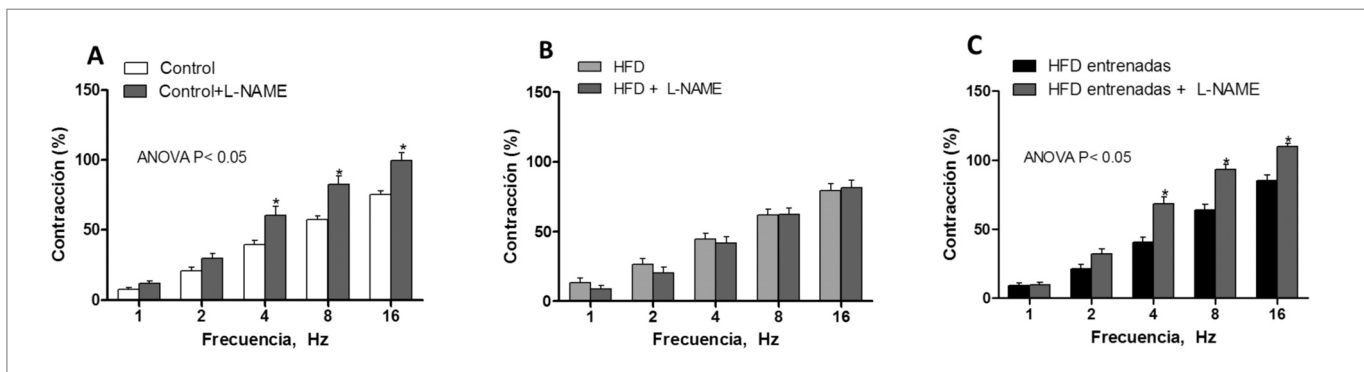
mentos de ratas HFD sedentarias (Figura 4). La liberación de NO inducida por EE y la expresión de nNOS fueron menores en segmentos de ratas HFD sedentarias (Figuras A y 5B). La formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y la respuesta vasodilatadora a DEA-NO fueron similares en segmentos sin endotelio de los tres grupos experimentales (Figuras 5C y 5D).

### Discusión

Los resultados de este estudio confirman la alteración en la función endotelial y neuronal en arteria mesentérica de rata con obesidad inducida por una dieta rica en grasa, debido a una disminución de la participación de NO. Esta disminución se produce por un aumento del metabolismo de NO endotelial provocado por un incremento en la liberación de especies reactivas de oxígeno, y por una menor liberación de NO neuronal debido a una menor expresión de nNOS. Estas alteraciones no se observan en ratas sometidas a una pauta de entrenamiento aeróbico moderado.



**Fig. 3.** Respuesta contráctil a EE en segmentos intactos (A) y sin endotelio (B) de ratas control, HFD y HFD entrenadas. La gráfica insertada muestra las diferencias de área bajo la curva en presencia/ausencia de endotelio. n= 10 animales por grupo experimental. \*P< 0.05 vs. Control. # P< 0.05 vs. HFD.



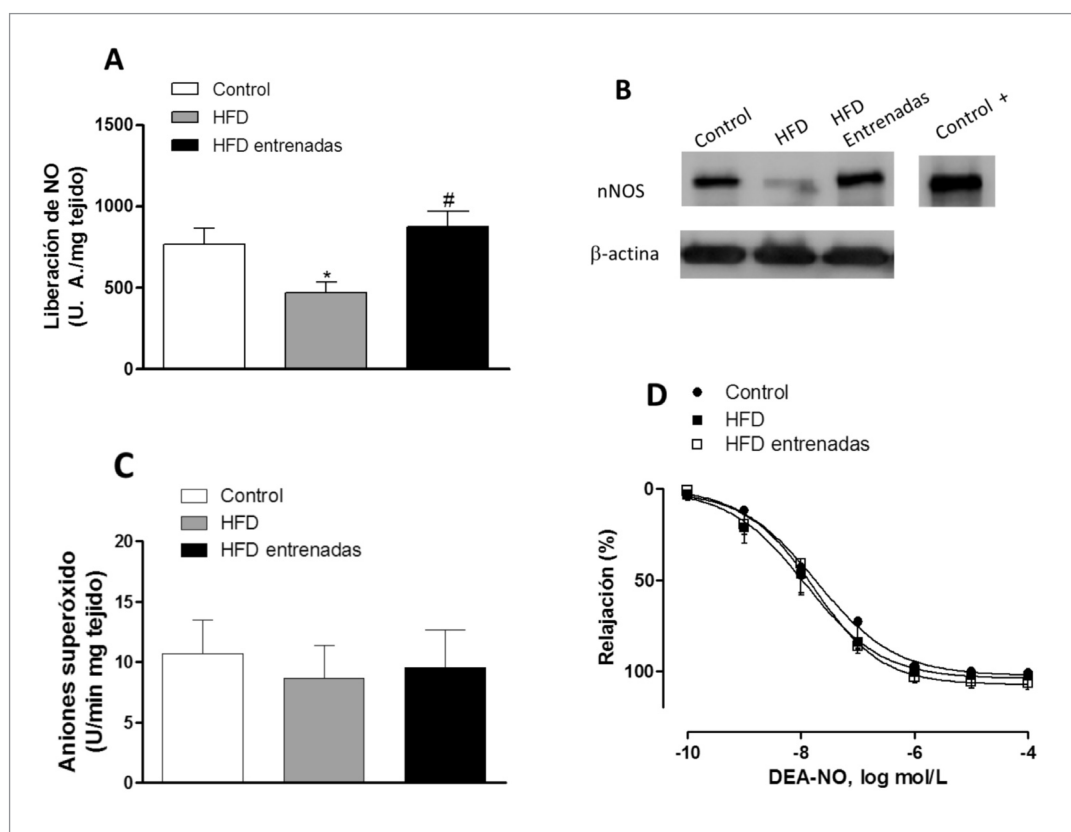
**Fig. 4.** Efecto del L-NAME sobre la respuesta vasoconstrictora a EE en segmentos sin endotelio de ratas control (A), HFD (B) y HFD entrenadas (C). n= 10 animales por grupo experimental. \*P< 0.05 vs. situación sin fármaco.

El tono arterial está regulado, entre otros, por factores endoteliales y neuronales. Cuando analizamos la función endotelial en arteria mesentérica superior, observamos una disminución en la respuesta vasodilatadora a ACh en segmentos de ratas HFD sedentarias en comparación con los controles, como se ha descrito en distintos lechos vasculares [1][10-12], que no se observó en segmentos de animales HFD entrenados [13][21]. Estos resultados indican que la disminución de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio induce un aumento de la resistencia vascular y, por lo tanto, puede participar en el desarrollo de hipertensión en ratas obesas, efecto que no tiene lugar cuando la dieta HFD se asocia con la práctica de ejercicio moderado. Nuestro siguiente objetivo fue analizar la posible implicación del NO endotelial en estas respuestas.

La vasodilatación a ACh en presencia del inhibidor no específico de la NO sintasa L-NAME fue menor en arterias de ratas HFD sedentarias con respecto al control de acuerdo con datos publicados previamente, mientras que se observa-

ron cambios con respecto al control en ratas HFD sometidas a un programa de ejercicio moderado [1][10][11][13][22]. Los resultados obtenidos de la cuantificación del NO liberado por ACh confirman la relación directa entre disfunción endotelial y liberación de NO, y que el ejercicio físico impide la disminución en la liberación de NO inducido por la dieta. El hecho de que la expresión de eNOS, no se viera modificada por dieta combinada o no con ejercicio lleva a hipotetizar que no es la síntesis, sino la disminución de la biodisponibilidad de NO la causa de la menor participación de este factor en la función endotelial.

Se ha descrito que la obesidad produce un aumento de estrés oxidativo, disminuyendo así la biodisponibilidad de NO, y que el entrenamiento moderado mejora los sistemas antioxidantes vasculares [13-16]. Estos datos sugieren que un aumento del metabolismo del NO sea la causa de la disfunción endotelial observada. El hecho de que la respuesta vasodilatadora al donante de NO DEA-NO fuese menor en segmentos de HFD sedentarias en comparación con ratas controles y



**Fig. 5.** (A) Liberación de NO inducida por EE en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas.  $n = 8$  ratas por grupo experimental. \* $P < 0.05$  vs. Control. #  $P < 0.05$  vs. HFD. (B) Imagen representativa de la expresión de nNOS en homogenados de arteria mesentérica de ratas control., HFD y HFD entrenadas.  $n = 4$  animales por grupo experimental. (C) Producción de aniones superóxido en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas.  $n = 6-8$  ratas por grupo experimental. (D) Respuesta vasodilatadora a DEA-NO en segmentos de ratas control, HFD y HFD entrenadas-  $n = 8$  animales por grupo experimental.

HFD entrenadas sugiere un aumento en el metabolismo del NO. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue estudiar posibles modificaciones en el proceso oxidativo en las distintas condiciones experimentales. La producción de aniones superóxido aumentó en segmentos mesentéricos de ratas HFD sedentarias, mientras que fue similar al grupo control en ratas HFD entrenadas. Estos resultados indican que el incremento del estrés oxidativo inducido por la obesidad no se produce en animales sometidos a una pauta de entrenamiento evitando la disfunción endotelial y, por lo tanto, uno de los factores que predisponen al desarrollo de hipertensión.

Nuestro siguiente objetivo fue analizar la posibilidad de que el ejercicio físico impidiera la disminución de la función nitrérgica observada previamente en arteria mesentérica de ratas HFD. La aplicación de EE produjo una respuesta contráctil dependiente de frecuencia que se debe a la liberación de neurotransmisores, puesto que es abolida por el bloqueante del impulso nervioso TTX. Esta respuesta

contráctil fue mayor en segmentos de ratas HFD sedentarias en comparación con ratas control, como ya habíamos descrito previamente [20]. Este incremento no se observó en arterias HFD entrenadas.

Se ha descrito que el endotelio puede modular la respuesta a diversas sustancias vasomotoras [23][24]. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar si las diferencias observadas entre los tres grupos experimentales se deben a la influencia del endotelio. En ausencia de endotelio la EE produjo un incremento similar en la respuesta vasoconstrictora en los tres grupos, indicando que las respuestas vasoconstrictoras a EE son independientes de endotelio. La respuesta vasoconstrictora a KCl es un indicador de la integridad de la maquinaria contráctil de las células del músculo liso vascular. La respuesta contráctil a KCl de la arteria mesentérica fue similar en los tres grupos experimentales indicando que las variaciones de la respuesta a EE no se deben a alteraciones en la capacidad de respuesta vasomotora.



Al analizar la participación del NO neuronal sobre la respuesta vasoconstrictora a EE, observamos que el L-NAME incrementó dicha respuesta en segmentos de animales control y HFD entrenados, mientras que no la modificó en HFD sedentarios como ya habíamos descrito [20], indicando que el ejercicio físico mantiene la liberación de NO de la innervación nitrérgica como en la situación control. Estos resultados fueron confirmados por el hecho de que la expresión de nNOS fue menor en animales HFD sedentarios, mientras que en segmentos de ratas HFD entrenadas fue similar que en ratas control. Estos resultados se corresponden con los datos observados en la liberación de NO neuronal.

Puesto que la túnica adventicia es una fuente de especies reactivas de oxígeno [25], no podemos descartar modificaciones en el metabolismo de NO neuronal. El hecho de que la respuesta vasodilatadora al donante de NO DEA-NO y que la formación de aniones superóxido fuera similar en segmentos de los tres grupos experimentales desprovistos de endotelio descarta esta hipótesis y pone de manifiesto que el incremento de TOS descrito en arterias de ratas obesas con endotelio se origina en el endotelio.

En conjunto, estos resultados indican que la disfunción de la innervación nitrérgica perivascular y endotelial inducidos por una dieta HFD no se produce con la práctica de ejercicio aeróbico moderado, evitando el desarrollo de mecanismos que favorecen la hipertensión. ■

### Agradecimientos

Para la realización de este trabajo se ha contado con ayudas de FUNDACIÓN MAPFRE y del Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38530). Esther Sastre es beneficiaria de una beca FPI-UAM. Nos gustaría agradecer a la Srta. Amanda Conde la ayuda técnica que ha ejercido en la realización de este trabajo.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Marco VG, Aroor AR, Sowers JR. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:364-76.
2. Lottenberg SA, Glezer A, Turatti LA. Metabolic syndrome: identifying the risk factors. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(Suppl 5):204-8.
3. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006; 55:928-34.
4. Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:1378-87.
5. Gómez-Cabrera MC, Doménech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:126-31.
6. Agarwal D, Haque M, Sriramula S, Mariappan N, Pariaut R, Francis J. Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2009; 54:1393-400.
7. Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y, Leung FP. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med* 2009; 39:45-63.
8. Kimura H, Kon N, Furukawa S, Mukaida M, Yamakura F, Matsumoto K, *et al.* Effect of endurance exercise training on oxidative stress in spontaneously hypertensive rats (SHR) after emergence of hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2010; 32:407-15.
9. Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, Galán M, Martínez-Revelles S, Avendaño MS, *et al.* Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. *Br J Pharmacol* 2013; 168:686-703.
10. De las Heras N, Martín-Fernández B, Miana M, Ballesteros S, Oubiña MP, López-Farré AJ, *et al.* The protective effect of irbesartan in rats fed a high fat diet is associated with modification of leptin-adiponectin imbalance. *J Hypertens* 2009; 27(suppl):37-41.
11. De las Heras N, Valero-Muñoz M, Ballesteros S, Gómez-Hernández A, Martín-Fernández B, Blanco-Rivero J, *et al.* Factors involved in rosuvastatin induction of insulin sensitization in rats fed a high fat diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013; 23:1107-14.
12. Ashraf MJ, Baweja P. Obesity: The 'huge' problem in cardiovascular diseases. *Mo Med* 2013; 110:499-504.
13. Roque FR, Hernanz R, Salaices M, Briones AM. Exercise training and cardiometabolic diseases: focus on the vascular system. *Curr Hypertens Rep* 2013; 15:204-14.
14. 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* 2011; 43:398-407.
15. Blanco-Rivero J, Roque FR, Sastre E, Caracul L, Couto GK, Avendaño MS, *et al.* Aerobic exercise training increases neuronal nitric oxide release and bioavailability and decreases noradrenaline release in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2013; 31:916-26.

16. Huang CJ, Webb HE, Zourdos MC, Acevedo EO. Cardiovascular reactivity, stress, and physical activity. *Front Physiol* 2013; 4:314.
17. Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrão CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1997; 273:2627-31.
18. Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 1976; 154:689-700.
19. Nielsen KC, Owman C. Contractile response and amine receptor mechanism in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res* 1971; 27:33-42.
20. Blanco-Rivero J, De las Heras N, Martín-Fernández B, Cachofeiro V, Lahera V, Balfagón G. Rosuvastatin restored adrenergic and nitregeric function in mesenteric arteries from obese rats. *Br J Pharmacol* 2011; 162:271-85.
21. Arvola P, Wu X, Kähönen M, Mäkynen H, Riutta A, Mucha I, *et al.* Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. *Cardiovasc Res* 1999; 43:992-1002.
22. Toda N, Okamura T. Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: an overview. *J Clin Pharmacol* 2013; 53:1228-39.
23. Li YJ, Duckles SP. Effect of endothelium on the actions of sympathetic and sensory nerves in the perfused rat mesentery. *Eur J Pharmacol* 1992; 210:23-30.
24. Iwatani Y, Kosugi K, Isobe-Oku S, Atagi S, Kitamura Y, Kawasaki H. Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. *Br J Pharmacol* 2008; 154:32-40.
25. Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cohen RA. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998; 82:810-8.

---

#### Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.