



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD

TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE FÁRMACOS
ANTIHIPERTENSIVOS, BLOQUEANTES DE
LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE
ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS DE LOS
SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA
SISTÉMICO Y TISURALES EN UN MODELO
GENÉTICO DE HIPERTENSIÓN**

PRESENTADA POR:
ANA BELÉN VILLAREJO VILLAR

DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. M^a ISABEL PRIETO GÓMEZ
DR. D. MANUEL RAMÍREZ SÁNCHEZ
DRA. DÑA. ANA BELÉN SEGARRA ROBLES

JAÉN, 7 DE JUNIO DE 2013

ISBN 978-84-8439-780-9



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Ciencias de la Salud
Área de Fisiología

**EFEECTO DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS,
BLOQUEANTES DE LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO
NÍTRICO Y DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN
EXTRA SOBRE ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS
DE LOS SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA
SISTÉMICO Y TISULARES EN UN MODELO
GENÉTICO DE HIPERTENSIÓN**

TESIS DOCTORAL

Ana Belén Villarejo Villar

JAÉN

Junio 2013



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Departamento de Ciencias de la Salud
Área de Fisiología

**EFEECTO DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS,
BLOQUEANTES DE LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO Y
DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE
ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS DE LOS SISTEMAS
RENINA-ANGIOTENSINA SISTÉMICO Y TISULARES EN
UN MODELO GENÉTICO DE HIPERTENSIÓN**

Memoria presentada por

Ana Belén Villarejo Villar

para optar al Grado de Doctor Internacional por la Universidad de Jaén

Directores:

Dra. Isabel Prieto Gómez

Dr. Manuel Ramírez Sánchez

Dra. Ana Belén Segarra Robles

Junio 2013

D^a ISABEL PRIETO GÓMEZ, PROFESORA TITULAR DE FISIOLÓGÍA,

D. MANUEL RAMÍREZ SÁNCHEZ, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA Y

**D^a ANA BELÉN SEGARRA ROBLES, INVESTIGADORA POSDOCTORAL
CONTRATADA POR LA UNIVERSIDAD DE JAÉN,**

CERTIFICAN:

**Que la tesis que presenta D^a ANA BELÉN VILLAREJO VILLAR titulada
“EFECTO DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS, BLOQUEANTES DE LA
SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN
EXTRA SOBRE ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS DE LOS SISTEMAS
RENINA-ANGIOTENSINA SISTÉMICO Y TISULARES EN UN MODELO
GENÉTICO DE HIPERTENSIÓN” para aspirar al grado de Doctora por la
Universidad de Jaén, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándola
suficientemente aventajada para hacerla acreedora de dicho título, siempre que así
lo considere el tribunal que designe la Universidad de Jaén.**

Jaén, 7 de Junio de 2013

Isabel Prieto Gómez

Manuel Ramírez Sánchez

Ana Belén Segarra Robles

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas quiero mostrar a todos mi más profundo agradecimiento desde el primer momento, por su acogimiento hace cuatro años en este grupo de investigación, por su ayuda, colaboración y participación en este trabajo que durante ese tiempo se ha estado elaborando y ha llegado a su fin.

Al Dr. D. Manuel Ramírez Sánchez, catedrático de Fisiología de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén y director de esta Tesis. Por su acogimiento, por su confianza, conocimientos, consejos, su disponibilidad permanente y sobre todo por su tiempo dedicado a mí.

A la Dra. D^a. Isabel Prieto Gómez, profesora titular de Fisiología de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén, y directora de esta Tesis. Agradecerle sinceramente y con todo el cariño su acogida desde el primer día en su laboratorio, por su labor docente en todo momento, por su buen hacer, la confianza depositada en mí y su disposición permanente, y sobre todo por su tiempo dedicado a mí. Muchas gracias por enseñarme a ver las cosas de otra manera, por su ánimo constante y sobre todo, por el cariño y afecto que me has demostrado en estos años.

A la Dra. D^a. Ana Belén Segarra Robles, directora de esta Tesis. Me faltarían páginas para escribir todo lo que has hecho por mí durante estos años. Desde el primer día has estado a mi lado, has sido para mí y espero que lo sigas siendo una gran amiga y compañera de laboratorio. Por esos momentos que hemos pasado juntas en el animalario, en la ultracentrífuga, en el laboratorio, y por ir superando juntas todos los inconvenientes que nos hemos ido encontrando a lo largo de estos cuatro años con una sonrisa. Me has enseñado a ver que todos los problemas tienen solución por difícil que

parezca. Todo lo que sé hacer en el laboratorio lo he aprendido de ti y sin tu ayuda este trabajo nunca hubiera llegado a su fin. Gracias por ser como eres.

A los tres directores de esta Tesis, Dr. D. Manuel Ramírez Sánchez, Dra. D^a Isabel Prieto Gómez y Dra. D^a Ana Belén Segarra Robles. Ha sido para mí un verdadero placer el poder estar todo este tiempo aprendiendo de vosotros y poder formarme tanto personal como profesionalmente. MUCHAS GRACIAS.

Al Área de Fisiología de la Universidad de Jaén, a la Dra. D^a Rosemary Wangenstein Fuentes, por sus enseñanzas y ayuda desinteresada, y por esos ratos compartidos en el laboratorio. A la Dra. D^a Inmaculada Banegas Font por su simpatía, su amistad, su cariño y su colaboración desde el primer día que nos conocimos.

To Dr. D. Patrick M.L. Vanderheyden and colleagues, from the Institute for Molecular Biology and Biotechnology of the Departament of Molecular and Biochemical Pharmacology of the Vrije Universiteit Brussel (Belgium), for accepting me kindly in his laboratory during four months, allowing me to expand my knowledge and being so patient with my English. Dr Vanderheyden and colleagues made my stay there a very positive experience and this allowed to perform this European thesis.

Al Ministerio de Educación por concederme la beca de movilidad para financiar mi estancia en el extranjero para la obtención del título con mención de europea, sin la cual no hubiera sido posible esta Tesis.

A mis padres, Luis y Simona, porque siempre me han ayudado y me han animado en mis estudios, por ser unas personas a las que admiro por su constancia en el trabajo y por luchar siempre juntos por lo que han querido,

son para mí un gran ejemplo a seguir. Siempre que os he necesitado habéis estado ahí con vuestro cariño, comprensión, apoyo constante y amor incondicional, guiándome siempre por el buen camino. A mi hermana Elena, por considerarme un ejemplo a seguir estimulándome mi esfuerzo a mejorar día a día.

Gracias a toda mi familia por animarme e interesarse por mí, por estar ahí cuando siempre los he necesitado y por hacerme pasar tan buenos momentos. Especialmente a mis sobrinas, Ana y María, por ese cariño que me dan cada día. Siempre están ahí, recibéndome con su sonrisa, y regalándome momentos inolvidables de risas y juegos, con un cariño y amor incondicional.

A mi marido Paco, por todos los años que llevamos juntos, por darme su cariño y por estar siempre ahí. Por su gran apoyo desde el comienzo, por los consejos y por la comprensión. Me has ayudado mucho para poder llegar hasta aquí y te seguiré necesitando para poder ir superando los obstáculos que nos vayan surgiendo. Por confiar siempre en mí y enseñarme a valorar las cosas importantes en la vida, por ayudarme a tomar decisiones y por hacerme sentir bien en aquellos momentos complicados. Muchas gracias, por ser la luz que ilumina mi vida.

Este trabajo fue apoyado por el Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto no. SAF 2008 04685 C02 01.

A MI MARIDO

Por su cariño, apoyo y confianza en todo momento.

Gracias por estar siempre ahí.

Índice

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL	23
1.1.1. Definición, epidemiología y prevalencia.	24
1.1.2. Regulación fisiológica de la presión arterial.	31
1.2. RATAS GENÉTICAMENTE HIPERTENSAS. MODELO SHR	34
1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)	37
1.3.1. Enzimas procesadoras y péptidos del sistema.	40
1.3.2. Receptores de las angiotensinas.	50
1.4. AMINOPEPTIDASAS E HIPERTENSIÓN ARTERIAL	54
1.4.1. Aminopeptidasas.	54
1.4.2. Aminopeptidasas y sistema renina angiotensina.	62
1.5. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA SISTÉMICO Y SISTEMAS RENINA-ANGIOTENSINA LOCALES	63
1.6. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CEREBRAL	67
1.7. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRA-RENAL	69
1.8. FÁRMACOS REGULADORES DE LA PRESIÓN ARTERIAL: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL	71
1.8.1. Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina.	72
1.8.2. Beta – Bloqueantes.	73
1.9. PRESIÓN ARTERIAL Y ÓXIDO NÍTRICO	75
1.9.1. Síntesis del Óxido Nítrico.	77
1.9.2. Disfunción endotelial en la hipertensión arterial.	78
1.9.3. El Óxido Nítrico y el Sistema Renina-Angiotensina.	80
1.9.4. El Óxido Nítrico en la hipertensión espontánea.	81
1.9.5. Inhibidores del Óxido Nítrico.	82
1.10. ACEITE DE OLIVA	84
1.10.1. Componentes del aceite de oliva. Composición química y nomenclatura.	87
1.10.2. Influencia del aceite de oliva virgen extra en la presión arterial.	93
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	101
Hipótesis	102
Objetivos	103

3. MATERIAL Y MÉTODOS	107
3.1. MATERIAL	107
3.1.1. Animales.	107
3.1.2. Equipo de análisis.	107
3.1.3. Productos químicos.	108
3.1.4. Disoluciones.	110
3.2. MÉTODOS	112
3.2.1. Grupos experimentales.	112
3.2.2. Medida de la presión arterial.	115
3.2.3. Ensayos de balance metabólico.	116
3.2.4. Curva de tolerancia a la glucosa.	117
3.2.5. Obtención de las muestras de plasma sanguíneo.	119
3.2.6. Obtención y preparación de las muestras de tejido.	120
3.2.7. Método de determinación enzimática.	122
3.2.8. Determinación de la concentración de proteínas.	124
3.2.9. Determinación de la creatinina.	124
3.2.10. Determinación del óxido nítrico.	125
3.2.11. Determinación de la concentración de 8-isoprostanos.	127
3.2.12. Determinación de metabolitos en plasma sanguíneo.	128
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	131
4. RESULTADOS	135
4.1. ESTUDIO METABÓLICO Y FISIOLÓGICO.	135
4.1.1. Efecto de fármacos antihipertensivos: Captopril y Propanolol.	135
4.1.2. Efecto de la inhibición de la óxido nítrico sintasa mediante la administración de L-Name.	140
4.1.3. Efecto de una dieta alta en grasa suplementada con aceite de oliva virgen extra.	145
4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS.	155
4.2.1. Fármacos antihipertensivos: captopril y Propanolol. Efecto sobre el sistema renina angiotensina periférico.	155
4.2.2. Fármacos antihipertensivos: captopril y Propanolol. Efecto sobre el sistema renina angiotensina cerebral.	155
4.2.3. Fármacos antihipertensivos: captopril y Propanolol. Efecto sobre el sistema renina angiotensina intra-renal.	157
4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME.	159
4.3.1. Efecto sobre el sistema renina angiotensina sistémico.	159
4.3.2. Efecto sobre el sistema renina angiotensina cerebral.	160
4.3.3. Efecto sobre el sistema renina angiotensina intra-renal.	161

4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.	163
4.4.1. Efecto sobre el sistema renina angiotensina sistémico de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra.	163
4.4.2. Efecto sobre el sistema renina angiotensina cerebral de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra.	164
4.4.3. Efecto sobre el sistema renina angiotensina intra-renal de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra.	165
 5. DISCUSIÓN	169
5.1. ESTUDIO METABÓLICO Y FISIOLÓGICO.	169
5.1.1. Efecto de fármacos antihipertensivos: Captopril y Propanolol.	169
5.1.2. Efecto de la inhibición de la óxido nítrico sintasa mediante la administración de L-Name.	181
5.1.3. Efecto de una dieta alta en grasa suplementada con aceite de oliva virgen extra.	191
 5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS.	210
5.2.1. Fármacos antihipertensivos: captopril y Propanolol. Efecto sobre el sistema renina angiotensina sistémico.	210
5.2.2. Fármacos antihipertensivos: captopril y Propanolol. Efecto sobre el sistema renina angiotensina cerebral.	213
5.2.3. Fármacos antihipertensivos: captopril y Propanolol. Efecto sobre el sistema renina angiotensina intra-renal.	218
 5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME.	225
5.3.1. Efecto sobre el sistema renina angiotensina sistémico.	225
5.3.2. Efecto sobre el sistema renina angiotensina cerebral.	227
5.3.3. Efecto sobre el sistema renina angiotensina intra-renal.	231
 5.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.	237
5.4.1. Efecto sobre el sistema renina angiotensina sistémico de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra.	237
5.4.2. Efecto sobre el sistema renina angiotensina cerebral de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra.	239
5.4.3. Efecto sobre el sistema renina angiotensina intra-renal de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra.	242
 6. CONCLUSIONES	251
 7. ABREVIATURAS	257
 8. BIBLIOGRAFIA	265

SUMMARY	301
1. INTRODUCCIÓN	301
2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES	306
3. MATERIALS AND METHODS	307
4. RESULTS AND DISCUSSION	311
4.1. INFLUENCE OF VASOACTIVE COMPOUNDS ON PHYSIOLOGIC AND METABOLIC PARAMETERS	311
4.1.1. Influence of the antihypertensive drugs Captopril and Propranolol.	311
4.1.2. Influence of the Inhibition of Nitric Oxide production by L-Name.	317
4.1.3. Influence of a diet enriched in Virgin Olive Oil.	323
4.2. INFLUENCE OF VASOACTIVE COMPOUNDS ON AMINOPEPTIDASE ACTIVITIES IN PLASMA, HYPOTHALAMUS AND KIDNEY	332
4.2.1. Influence of the antihypertensive drugs Captopril and Propranolol.	332
4.2.2. Influence of the Inhibition of Nitric Oxide production by L-Name.	340
4.2.3. Influence of a diet enriched in Virgin Olive Oil.	346
5. GLOBAL ANALYSIS	353
6. CONCLUSIONS	357
7. ACKNOWLEDGEMENTS	360
8. REFERENCES	361

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Es fascinante comprobar los avances que han tenido lugar durante los últimos años en el conocimiento de la fisiopatología de la hipertensión arterial (HTA) y en el logro de un mejor control de la misma y por tanto en la prevención y control de las enfermedades cardiovasculares (ECV) (Banegas, 2005).

Las ECV se deben a trastornos del corazón y los vasos sanguíneos. Entre ellas destacan las cardiopatías coronarias, las enfermedades cerebro vasculares, el aumento de la presión arterial (PA), las vasculopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas, las cardiopatías congénitas y la insuficiencia cardiaca.

Nos encontramos en una sociedad donde cada vez son más frecuentes este tipo de enfermedades, siendo las ECV la primera causa de mortalidad en el mundo occidental, y todo parece indicar que lo seguirán siendo en las próximas décadas si tenemos en cuenta el envejecimiento de la población, constituyendo por tanto, un problema de salud de primera magnitud. Son muy bien conocidos los factores de riesgo, en relación a los estilos de vida y a los parámetros biológicos que pueden predecir la incidencia de cualquiera de sus manifestaciones clínicas (Serrano-Martínez, 2008).

Desde hace años conocemos la relación causal entre diversas entidades nosológicas, conocidas como factores de riesgo (FR) y las ECV, y esta evidencia científica persiste en nuestros días. Es bien conocido desde hace tiempo que, cuando la presión sanguínea elevada se mantiene de forma sostenida en el tiempo, se producen múltiples efectos adversos en el sistema cardiovascular. Ya en la primera mitad de este siglo las compañías americanas de seguros aportaron datos que demostraron la mayor mortalidad global y cardiovascular de los hipertensos. Sin ninguna duda, la HTA es el FR cardiovascular más prevalente en la población general (Serrano-Martínez, 2008). El control de los FR se basa no sólo en el tratamiento farmacológico sino también, y con una relevancia cada vez mayor, en el estilo de vida, cuyos pilares fundamentales son la dieta y el ejercicio físico (Banegas et al., 2002).

1.1.1. DEFINICIÓN, EPIDEMIOLOGÍA Y PREVALENCIA

La presión arterial (PA) es la fuerza ejercida por la sangre circulante sobre las paredes de los vasos sanguíneos (ver figura 1) y constituye uno de los principales signos vitales. La presión de la sangre, que depende del flujo sanguíneo y de las resistencias que se oponen a él, disminuye a medida que la sangre se mueve a través de arterias, arteriolas, capilares y venas. Los valores de PA se expresan en milímetros de mercurio (mmHg), es una de las variables hemodinámicas más importantes y de ella depende la adecuada perfusión de los tejidos. Se ha convenido en admitir como límite superior de la normalidad valores de 140 mmHg para la presión sistólica y de 90 mmHg para la diastólica (Castro del Pozo, 2001).

El corazón se encarga de bombear la sangre que circula por nuestro organismo. Para ello, el ventrículo izquierdo del corazón se contrae y se relaja de forma cíclica, de manera que con cada contracción (sístole) empuja o bombea la sangre a las arterias, para después relajarse (diástole) y volver a llenarse de sangre (Rang et al., 2004).

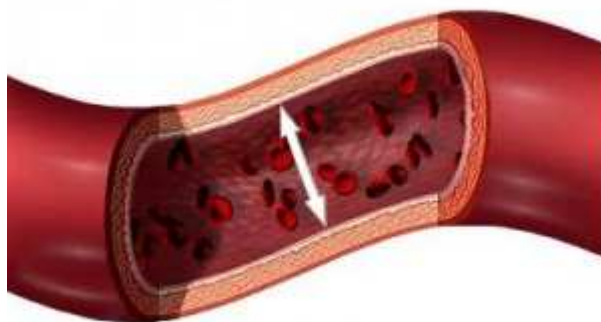


Figura 1. Vaso sanguíneo, donde se observa la presión que ejerce la sangre sobre la pared arterial.
<http://www.adam.com/healthsolutions.aspx>

En el 90% de los casos, la causa de la HTA es desconocida, por lo cual se denomina “hipertensión arterial esencial”, con una fuerte influencia hereditaria. Sólo entre el 5 y el 10% de los casos existe una causa directamente responsable de la elevación de las cifras tensionales. A esta forma de hipertensión se la denomina “hipertensión arterial secundaria”, que no sólo puede en ocasiones ser tratada y desaparecer para siempre sin requerir tratamiento a largo plazo, sino que además puede

ser la alerta para localizar enfermedades aún más graves, de las que la HTA es únicamente una manifestación clínica (Guía Española de Hipertensión Arterial, 2005).

La HTA puede clasificarse en función de los niveles de PA. La tabla 1 muestra la clasificación de los niveles de presión arterial (PA) promulgada por la European Society of Hypertension (ESH) y la European Society of Cardiology (ESC) en 2007 (Mancia et al., 2007).

Categoría	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Presión Arterial Diastólica (mmHg)
OPTIMA	< 120	<80
NORMAL	120-129	80-84
NORMAL – ALTA	130-139	85-89
HIPERTENSIÓN GRADO 1 (leve)	140-159	90-99
HIPERTENSIÓN GRADO 2 (moderada)	160-179	100-109
HIPERTENSIÓN GRADO 3 (grave)	>180	>110

Tabla 1. Clasificación de los niveles de PA promulgada por la European Society of Hypertension (ESH) y la European Society of Cardiology (ESC) en 2007.

La HTA se considera una de las patologías crónicas de mayor prevalencia, ya que alrededor del 15% de la población mundial está diagnosticada como hipertensa (Mancia et al., 2007). Conocida como el enemigo silencioso, la HTA en sus inicios es difícil de diagnosticar, ya que las manifestaciones que produce generalmente aparecen cuando la enfermedad ha avanzado lo suficiente como para producir daños en órganos diana, como el cerebro, corazón y riñones.

El riesgo absoluto individual de desarrollar una ECV depende no sólo de los niveles de PA, sino además de otros factores de riesgo cardiovascular y trastornos clínicos asociados, de tal modo que los individuos no hipertensos con varios FR estarán con frecuencia en mayor riesgo absoluto de eventos cardiovasculares relacionados con la PA que los individuos hipertensos pero sin otros factores de riesgo (Banegas, 2005).

La HTA presenta una prevalencia considerable en los países desarrollados, afectando a casi el 40% de los adultos. En España la HTA también constituye un

importante problema de salud pública. En concreto, en la población general adulta de España la prevalencia de la HTA es de aproximadamente un 35%, llegando al 40% en edades medias y a más del 60% en los mayores de 60 años (ver tabla 2), afectando en total a unos 10 millones de individuos adultos (Banegas, 2005).

CARÁCTER DE LA PA	NORMOTENSIÓN O HTA CONTROLADA			HIPERTENSIÓN		
	ÓPTIMA	NORMAL	NORMAL-ALTA	GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3
Prevalencia en personas de 35-60 años	23,4 %	16,7 %	17%	28,3%	11,2%	3,4%
Prevalencia en personas $\geq$ 60 años	9,9%	13,8%	19,8%	36,5%	15,2%	4,7%

Tabla 2. Distribución porcentual de los niveles de PA e HTA en España (Banegas, 2005).

En realidad, la HTA no es sino el iceberg clínico de un problema más amplio, el problema de salud pública de la PA. Esto es debido a que un gran número de individuos (34%) tienen niveles de PA considerados no hipertensivos, pero tampoco óptimos (ver tabla 2) lo que, dada la continuidad del riesgo cardiovascular a lo largo de los niveles de PA, hace que una proporción apreciable de eventos cardiovasculares ocurran en niveles de PA considerados, todo lo más, como prehipertensión. Así, de las aproximadamente 54.000 muertes totales anuales ocurridas en la población española de edades medias en los años noventa, unas 17.000 son atribuibles a la PA elevada ($\geq$ 20/80 mmHg); es decir, algo más del 30% de todas las defunciones. De ellas, unas 3.500 muertes (20% de las muertes atribuibles) recaen en niveles de la PA considerados normales o normales-altos, donde están un tercio de los individuos (Banegas, 2005).

El grado de conocimiento y tratamiento farmacológico de la HTA en la población general de España es moderadamente alto, pero el control es escaso, sobre todo el de la presión arterial sistólica (PAS), como podemos observar en la tabla 3. Aunque la situación epidemiológica varía entre estudios, podemos decir que de cada 10

hipertensos adultos tratados farmacológicamente, prácticamente 8 no están controlados (Banegas y Rodríguez, 2002).

CRITERIO 140/90 mmHg	PORCENTAJES POR AÑOS			
	<i>1980</i>	<i>1990</i>	<i>1998</i>	<i>2002</i>
Prevalencia	30	35	35	35
Conocimiento	40	50	60	65
Tratamiento en hipertensos conocidos	40	72	78	85
Tratamiento total	16	36	50	55
Control en hipertensos tratados	10	13	16	25
Control total	2	5	8	15

Tabla 3. Magnitud y manejo de la HTA en adultos en la población general de España, 1980-2000 (Banegas y Rodríguez, 2002).

La relación entre las cifras PA y el riesgo cardiovascular (RCV) es continua e independiente de otros FR, de modo que, a mayores cifras de presión arterial (PA) mayor será la probabilidad de sufrir un evento cardiovascular. La Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con la Sociedad Internacional de Hipertensión, establecen una estratificación de riesgo cardiovascular que relaciona la HTA con la presencia en el mismo individuo de otros FR (Llabata et al., 2005).

	PA normal	PA normal –alta	HTA I	HTA II	HTA III
Sin FR	Riesgo de Referencia	Riesgo de Referencia	Riesgo bajo	Riesgo moderado	Riesgo alto
1-2 FR	Riesgo bajo	Riesgo bajo	Riesgo moderado	Riesgo moderado	Riesgo muy alto
3 o más FR o lesión de órgano diana o diabetes	Riesgo moderado	Riesgo alto	Riesgo alto	Riesgo alto	Riesgo muy alto
ECV asociada	Riesgo alto	Riesgo muy alto	Riesgo muy alto	Riesgo muy alto	Riesgo muy alto

Tabla 4. Estratificación de riesgo cardiovascular (Llabata et al., 2005).

Según el Atlas Global para la Prevención y el Control de las Enfermedades Cardiovasculares, publicado por la OMS en colaboración con la Federación Mundial del Corazón y la Organización Mundial del Ictus, la HTA causa la muerte de 7,5 millones de personas en todo el mundo (12,8% del total de muertes) (World Health Organization, 2010). En las figuras 2 y 3, se muestra la distribución a nivel mundial de la hipertensión tanto en hombres como en mujeres. En adultos mayores de 25 años, la prevalencia de esta enfermedad aumentó un 40% en 2008 (World Health Organization, 2010).

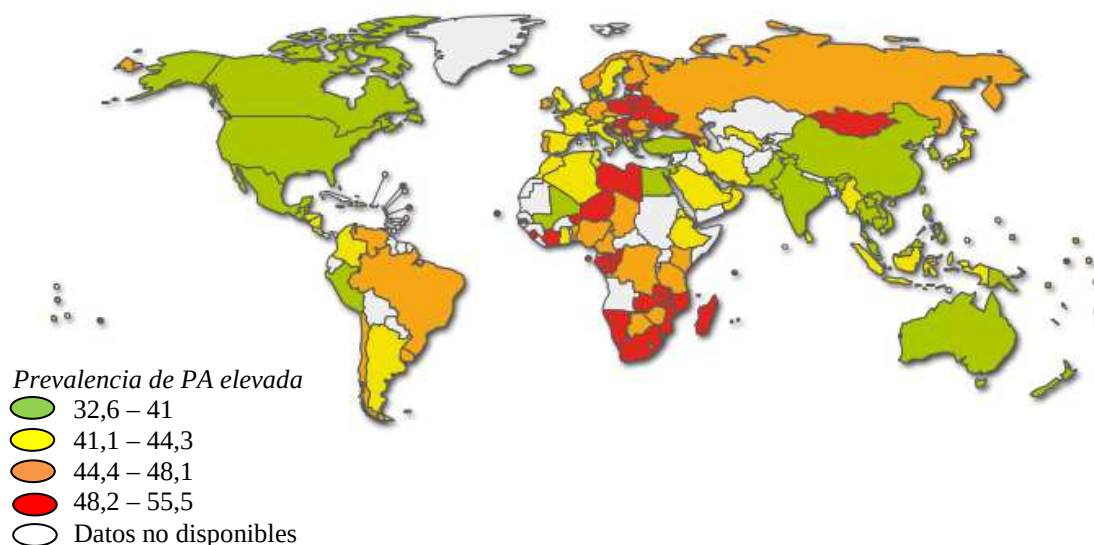


Figura 2. Mapa mundial que muestra la prevalencia de HTA en hombres (edades 25 +, la edad estandarizada) * PAS $\geq$ 140 y / o PAD $\geq$ 90 (WHO, 2010).

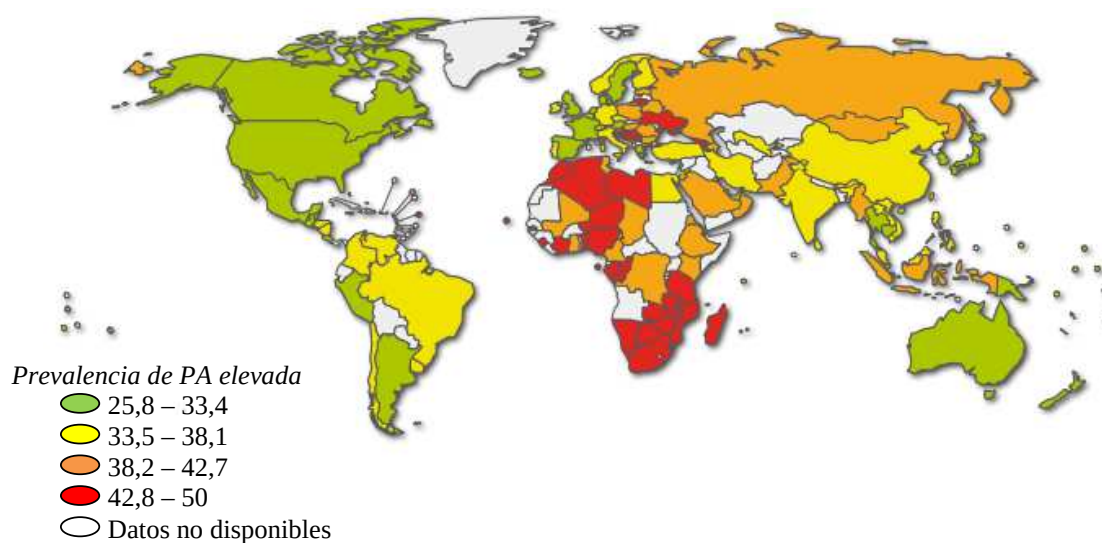


Figura 3. Mapa mundial que muestra la prevalencia de HTA en mujeres (edades 25 +, la edad estandarizada) * PAS $\geq$ 140 y / o PAD $\geq$ 90 (WHO, 2010).

Existen diversos factores de riesgo que influyen en la hipertensión y que podemos modificar para mantenernos saludables y conseguir controlar el aumento de la presión arterial (Kumar et al., 2009). Algunos son:

- *Exceso de peso*: el riesgo de hipertensión es de 2 a 6 veces mayor en personas con sobrepeso.
- *Tabaquismo*: fumar daña los vasos sanguíneos, y por cada cigarrillo diario se aumenta la PA en 5 mmHg.
- *Grasas saturadas*: la alimentación rica en grasas animales aumenta el colesterol LDL.
- *Ingerir más productos naturales*, como frutas y verduras frescas.
- *Consumo alto de alcohol*.
- *Consumo de sal*: la reducción de su ingesta facilita en gran medida el control de la PA, constituyendo así uno de los pilares del tratamiento antihipertensivo.
- *La inactividad física*.

Pero además de todos estos factores, existen otros que no podemos modificar, como son:

- *Herencia*: los hijos de padres hipertensos suelen tener cifras de presión arterial más elevadas que los hijos de padres normotensos, lo cual no ocurre con los hijos adoptados.
- *Edad y sexo*: la PA aumenta más en varones que en mujeres por debajo de los 50 años.
- *Raza*: la HTA es más frecuente en individuos de raza negra, produciendo por ello mayor número de eventos por accidente vascular cerebral e infarto de miocardio.

Una publicación basada en estudios de ámbito nacional en 6 países europeos, EE.UU y Canadá, estimó que en la pasada década el control de la HTA en España era relativamente similar al de otros países europeos (8% de media para Europa en su conjunto), pero bastante inferior al de EE.UU y Canadá (23%) (Guía Española de Hipertensión Arterial, 2005).

Por tanto, la HTA constituye uno de los problemas socio-sanitarios más importantes a nivel mundial, tanto por la morbilidad que provoca como por la ingente cantidad de recursos económicos que se emplean en su tratamiento y en el de las patologías derivadas (Llabata et al., 2005). Por este motivo, el control de la HTA y la reducción de la PA a niveles óptimos, constituye una prioridad en salud pública. Si el control de la HTA y otros factores de riesgo no mejora, la carga sanitaria y económica de las enfermedades cardiovasculares, renales y neurológicas derivadas se incrementará sustancialmente en las próximas décadas, debido al envejecimiento de la población y a la alta prevalencia de HTA y otros factores de riesgo asociados (Banegas, 2005).

En cuanto a la investigación en este campo, el gran aporte económico empleado se está viendo reflejado en grandes avances en los campos de la biología molecular y la genética, permitiendo conocer los mecanismos mediadores del control de la PA, lo que redundará en una terapéutica más objetiva. Por ejemplo, en los últimos años ha habido un gran desarrollo en el conocimiento del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) y del papel del endotelio vascular, que está considerado un órgano complejo y dinámico que interactúa con elementos estructurales del vaso, así como con mediadores que son producidos por el mismo endotelio, como la endotelina o el óxido nítrico, que influyen en la remodelación vascular, factor crucial en la patogenia de las enfermedades vasculares (Cabrera, 1997).

Desde hace tiempo se sabe que en la cuenca del Mediterráneo las tasas de ECV son inferiores a las de países del norte de Europa (Baena et al., 2005). En España, el estudio multicéntrico PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea), en el que participan pacientes de alto riesgo cardiovascular, ha demostrado en los primeros tres meses tras la asignación aleatoria de los pacientes a dieta mediterránea enriquecida en aceite de oliva extra virgen o a dieta control pobre en grasa, que no sólo la adherencia a la dieta era correcta, sino que la PA descendió significativamente en el grupo de dieta mediterránea, mientras que no se modificó en el grupo de dieta pobre en grasa total. La reducción de la presión sistólica y diastólica en el grupo con dieta enriquecida en aceite de oliva fue de 4,8 y 2,5 mm de Hg respectivamente. El descenso fue significativo frente al observado en el grupo control y frente a las cifras de partida del propio grupo. Además, mejoró la sensibilidad a la insulina sin cambios diferenciales en el peso ni en el perímetro de la cintura. Estas evidencias, trasladadas mediante diversas estrategias a toda la población, reducirían la incidencia de hipertensión de modo sustancial, el riesgo

cardiovascular prevalente en la población general, y por consiguiente la necesidad de tratamientos farmacológicos (Serrano-Martínez, 2008).

Además de la dieta, es también conocido el efecto de la actividad física sobre las cifras de PA y sobre la morbimortalidad cardiovascular en general. Los ensayos, en general de breve duración, demuestran reducciones significativas tanto de la presión sistólica como de la diastólica y en un estudio realizado con una cohorte española, la incidencia de hipertensión se ha relacionado directamente con el sedentarismo (Serrano-Martínez, 2008).

En cuanto a la evolución futura de la prevalencia de la HTA, según algunos estudios ésta afectará al 29% de todos los adultos del mundo en el año 2025, desde un 26% estimado en el año 2000. Esta misma previsión estima que en 2025 la HTA habrá aumentado un 24% en los países desarrollados y hasta un 80% en aquéllos en vías de desarrollo. Aunque esta predicción es a 25 años, demasiado tiempo para un futuro en gran manera imprevisible, marca una tendencia de evolución desfavorable de la que debemos tomar buena nota a corto plazo, y tener en cuenta el envejecimiento progresivo de la población (Banegas, 2005).

1.1.2. REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La regulación de la PA es muy compleja y consta de múltiples sistemas de control, que prácticamente involucran a todo el organismo y que están interrelacionados entre sí. Esto hace que existan dificultades a la hora de conocer su funcionamiento. A día de hoy, se continúa avanzando para identificar con precisión los mecanismos que intervienen en la regulación de la PA, y con ello la causa específica de la HTA (Castro del Pozo, 2001).

La necesidad de regular la PA se debe a que en todo momento este parámetro debe alcanzar una magnitud que permita asegurar la perfusión de todos los tejidos. Como en el organismo la perfusión de la circulación cerebral es la que presenta mayor dificultad, el nivel de presión viene determinado por ella. La PA depende de la resistencia periférica (RP) y del volumen minuto o gasto cardíaco (GC), el cual a su vez depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardíaca (Castro del Pozo, 2001).

Por tanto, la PA es una variable hemodinámica que dispone de varios sistemas de regulación, ya que las necesidades de los tejidos no son constantes y las demandas son variables. Entre los diversos mecanismos de regulación que participan, los hay que actúan con carácter rápido, intermedio o lento (Castro del Pozo, 2001).

Mecanismos rápidos

Estos mecanismos inician su acción en el rango de los segundos y se prolongan hasta 24 ó 48 horas. Los mecanismos de acción rápida dependen fundamentalmente del sistema nervioso, el cual actúa de manera refleja. Por lo tanto, constan de cuatro componentes básicos: vía aferente, centro integrador, vía eferente y sistema efector (Guyton, 2001).

El mecanismo de control nervioso funciona tanto durante los aumentos como en las bajadas de PA. En el primer caso, los barorreceptores aumentan progresivamente su capacidad de respuesta por encima de los 60 mmHg, alcanzando su máxima capacidad de disparo alrededor de los 180 mmHg. Los impulsos eléctricos generados inhiben al centro vasoconstrictor y excitan al vasodilatador, lo cual produce vasodilatación arteriolar, disminución de la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca y aumento de la eliminación de líquidos. En el caso contrario, ante una hipotensión arterial, los barorreceptores suprimen su actividad cuando las cifras oscilan entre 0 y 60 mmHg, un efecto que automáticamente aumenta la actividad de las neuronas del centro vasoconstrictor; lo que causa vasoconstricción, aumento del bombeo ventricular y una disminución de la diuresis. La limitación del mecanismo reflejo es que pierde su capacidad de control después de 24 ó 48 horas de estímulo mantenido, debido a que los barorreceptores aumentan su umbral de excitabilidad cuando el estímulo se prolonga en el tiempo (Guyton, 2001).

Un segundo mecanismo de respuesta, operando también en un rango de segundos, se encuentra en los líquidos corporales. Intervienen algunos iones, como el sodio, potasio, calcio, magnesio, y dos gases disueltos (oxígeno y dióxido de carbono) que influyen en la homeostasis de la PA con actividad vasoconstrictora; en tanto que la glucosa produce vasodilatación arteriolar (Cruz, 2004).

Mecanismos intermedios

La actividad de control de este grupo empieza aproximadamente veinte minutos después de establecido el desajuste de la PA. En este grupo nos encontramos algunos de los mecanismos que dependen del sistema hormonal, donde cabe destacar el sistema renina angiotensina aldosterona (Guyton, 2001).

Constituye el mecanismo de control de la PA más profuso y complejo. Está representado por una variedad de sustancias hormonales de naturaleza química diversa que operan en conjunto o individualmente, tanto en los aumentos como en las bajadas de la presión sanguínea. Desde el comienzo del cambio de la presión arterial actuarán conjuntamente el sistema hormonal y el nervioso, pero la actividad hormonal cobra mayor importancia cuando la eficacia de la respuesta nerviosa disminuye. Es más lenta en comenzar a actuar, tarda minutos, aunque no cabe duda de que es el sistema de control de la PA más eficiente a largo plazo (Guyton, 2001). Dos son los efectos a través de los cuales actúa este sistema. En primer lugar, regulando el tono vascular (hormonas vasoactivas) y/o la actividad cardíaca (frecuencia, contractilidad...); y en segundo lugar actuando directamente sobre el riñón, controlando el volumen extracelular y plasmático, determinantes en el gasto cardíaco. Dentro de este grupo podemos encontrar el SRAA que se activa cuando baja la PA por disminución del volumen sanguíneo y/o la concentración de sodio plasmático, principalmente. En cuanto a las acciones renales, se reduce la excreción urinaria de sodio y agua, y se incrementa la excreción de potasio (Cruz, 2004).

Mecanismos lentos

Integrados por el binomio riñón/líquidos corporales. Su acción empieza varias horas después del desajuste de la PA, pero su duración es prácticamente infinita, por lo que no cabe duda que es el sistema de control de la PA más eficiente a largo plazo (Cruz, 2004).

El riñón mantiene el control de la PA mediante dos mecanismos de acción básicos: la filtración y la reabsorción de líquidos y solutos. A estos dos mecanismos de acción básicos debe agregarse el fenómeno de ósmosis, íntimamente relacionado con ellos, debido a su gran importancia de la dirección del movimiento del agua (Cruz, 2004).

El mecanismo que autorregula la velocidad de la filtración y el flujo sanguíneo glomerular, a efecto de mantenerlo en niveles constantes, corre a cargo del aparato yuxtaglomerular, integrado por la mácula densa, conjunto de células epiteliales en contacto íntimo con las arteriolas y las células yuxtaglomerulares, que son células musculares lisas de las arteriolas aferentes y eferentes (Guyton, 2001).

La estratégica localización del aparato yuxtaglomerular sugiere que el líquido del túbulo distal juega un importante papel en el control funcional de la nefrona, a través de potentes señales retroalimentadoras entre dichas estructuras (Cruz, 2004). Así, por ejemplo, ante una bajada de la filtración glomerular, aumenta la reabsorción de iones de sodio y cloro en la rama ascendente del asa de Henle y, consecuentemente, disminuye la concentración iónica de la mácula densa. Este cambio iónico genera a su vez dos señales de retroalimentación, una dilata la arteriola aferente, y por tanto aumenta el flujo sanguíneo y la presión glomerular; y la otra libera renina de las células yuxtaglomerulares para formar angiotensina II. Acto seguido, esta molécula produce vasoconstricción de la arteriola eferente, y contribuye al aumento de la presión intraglomerular. La acción conjunta de ambos mecanismos retorna la filtración glomerular a los niveles requeridos, y la mantiene constante a pesar de las variaciones considerables de la presión arterial sistémica (Guyton, 2001).

La acción de estos tres mecanismos, con diferentes tiempos de acción, son los responsables de llevar a cabo la regulación normal de la presión sanguínea.

El SRA se incluye tanto en los mecanismos intermedios como en los lentos. En los intermedios por las acciones periféricas de la Ang II que produce vasoconstricción arterial; y en los lentos por las acciones directas sobre el riñón modificando la filtración glomerular.

1.2. RATAS GENÉTICAMENTE HIPERTENSAS. MODELO SHR

En los seres humanos existen múltiples factores relacionados con la etiología de la hipertensión. Experimentalmente, las ratas genéticamente hipertensas tales como las Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), se consideran un buen modelo animal para estudiar la hipertensión esencial y han sido ampliamente utilizadas para estudiar las ECV.

El SHR es el modelo más estudiado de HTA, si consideramos el número de publicaciones. El origen de la cepa SHR se obtuvo durante la década de 1960 por Okamoto y Aoki, mediante el cruce de un macho de la raza Wistar Kyoto (WKY) con hipertensión espontánea y una hembra con valores de PA un poco más altos de lo normal. Posteriormente, se obtuvieron una serie de sublíneas, a partir de las cuales se han ido seleccionando aquellas con una mayor tendencia a desarrollar lesiones cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares e hipercolesterolemia (Okamoto y Aoki, 1963).

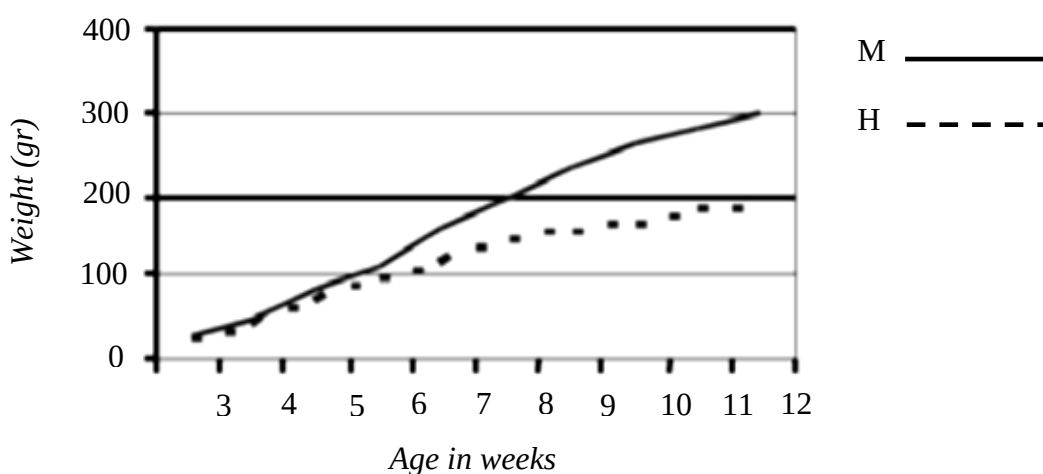


Figura 4. Curva de crecimiento del modelo animal SHR, siendo M: machos y H; hembras. (Okamoto and Aoki, 1963).

En cuanto a la anatomía de este modelo, el peso corporal de las ratas macho es bajo en las 10 primeras semanas, (ver figura 4) además de presentar un elevado peso relativo del corazón aproximadamente a las 10 semanas de edad (Tanase et al., 1982).

Además, las ratas SHR presentan resistencia a la insulina, siendo un modelo adecuado para el estudio de este signo junto con la hipertensión esencial en humanos no obesos. Las ratas SHR cuentan con menos glomérulos renales que las ratas WKY, pero son de tamaño similar, presentando en consecuencia un volumen glomerular reducido. Esto está de acuerdo con la hipótesis de que el riñón desempeña un papel muy importante en la aparición de la hipertensión (Skov et al., 1994). Las ratas SHR se han utilizado profusamente como modelo para el desarrollo de fármacos antihipertensivos.

Desde el punto de vista fisiopatológico, este modelo animal comienza con el desarrollo de HTA alrededor de las 5-6 semanas de edad (ver figura 5), llegando a alcanzar valores de presión sistólica entre 180 y 200 mmHg en la fase de edad adulta.

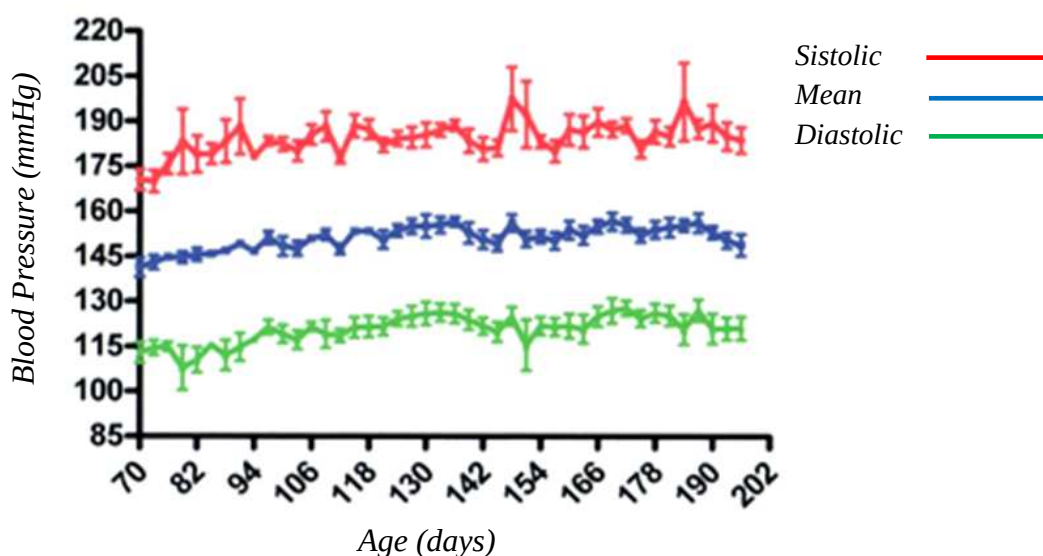


Figura 5. Desarrollo de la PA en un modelo animal genéticamente hipertenso (Skov et al., 1994).

Entre las semanas 40 y 50, en las ratas SHR se pueden desarrollar la hipertrofia vascular y cardiaca (Conrad et al., 1995). En algunos animales se pueden observar valores de PA incluso mayores a la media de las SHR y consecuentemente poder sufrir accidentes cerebro-vasculares (Conrad et al., 1995).

Como ocurre en el caso de la hipertensión humana, el riñón es el primer sospechoso de la fisiopatología de la HTA en el modelo animal de ratas SHR. En estos animales, el trasplante de un riñón de WKY normotensas normaliza los valores de PA. Estos beneficios se observan incluso si el trasplante se lleva a cabo a una edad temprana, antes de que la hipertensión se haya establecido la función preponderante de los riñones en el desarrollo de la HTA en el modelo animal SHR. Curiosamente, los riñones de las SHR muestran algunos cambios adaptativos o compensatorios. Por ejemplo, los riñones trasplantados de SHR a un destinatario hipertenso pueden mantener sus características estructurales mejor que los riñones trasplantados a ratas normotensas, demostrando una adaptación a la PA alta. En ocasiones puede aparecer calcificación de los vasos, como a veces ocurre en los seres humanos, y los niveles de fosfatasa alcalina (un marcador de calcificación vascular) son significativamente superiores en las células

musculares lisas de la aorta de las SHR en comparación con células similares de WKY. Sin embargo, el cambio más interesante en las SHR son las alteraciones del metabolismo del calcio, con una reducción en el transporte activo de calcio en el intestino y un exceso de pérdida a través de la orina, lo que ocasiona en la mayoría de los casos hipocalcemia (Kundu y Rao, 2008).

Los cambios histopatológicos pueden aparecer en ratas macho cuando alcanzan los 8 meses de edad, y en las hembras con una edad aproximada de 12-15 meses. Además, las hembras SHR viven significativamente más tiempo que los machos. La base genética de este desarrollo de HTA es poligénica, con al menos tres genes principales implicados (Tanase y Suzuki, 1971).

Hay una alta incidencia de ECV en estos animales, pero una baja incidencia de accidente cerebrovascular, que puede aumentar hasta alrededor del 30% con el estrés crónico. Yamori en 1984 estableció que las ratas SHR muestran un incremento funcional en la resistencia vascular periférica, que en su mayoría depende de mecanismos neurogénicos, lo que probablemente tiene su origen en un trastorno de la regulación central de la PA. La PA “*per se*”, y el aumento del tono neurogénico, aceleran la síntesis de proteínas estructurales cardiovasculares e inducen cambios estructurales en la vasculatura, lo que contribuye al mantenimiento de la hipertensión (Yamori, 1984).

1.3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

El Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) desempeña un importante papel en la regulación de la PA, el equilibrio hidrosalino y en el mantenimiento de la estructura y función del aparato cardiovascular. Como consecuencia de ello, el SRAA está implicado en la génesis de la HTA y de la insuficiencia cardíaca y renal. Estas acciones, producidas fundamentalmente por la angiotensina II (Ang II), están mediadas a través de receptores específicos que existen en la superficie de las células diana (AT1 y AT2) (Ramírez et al., 2008).

El SRAA consiste en una cascada de interacciones entre enzimas y sustratos que culminan con la producción de Ang II, el péptido activo responsable de los efectos conocidos de este eje bien difundido en todo el organismo (Mauer et al., 2001). Este

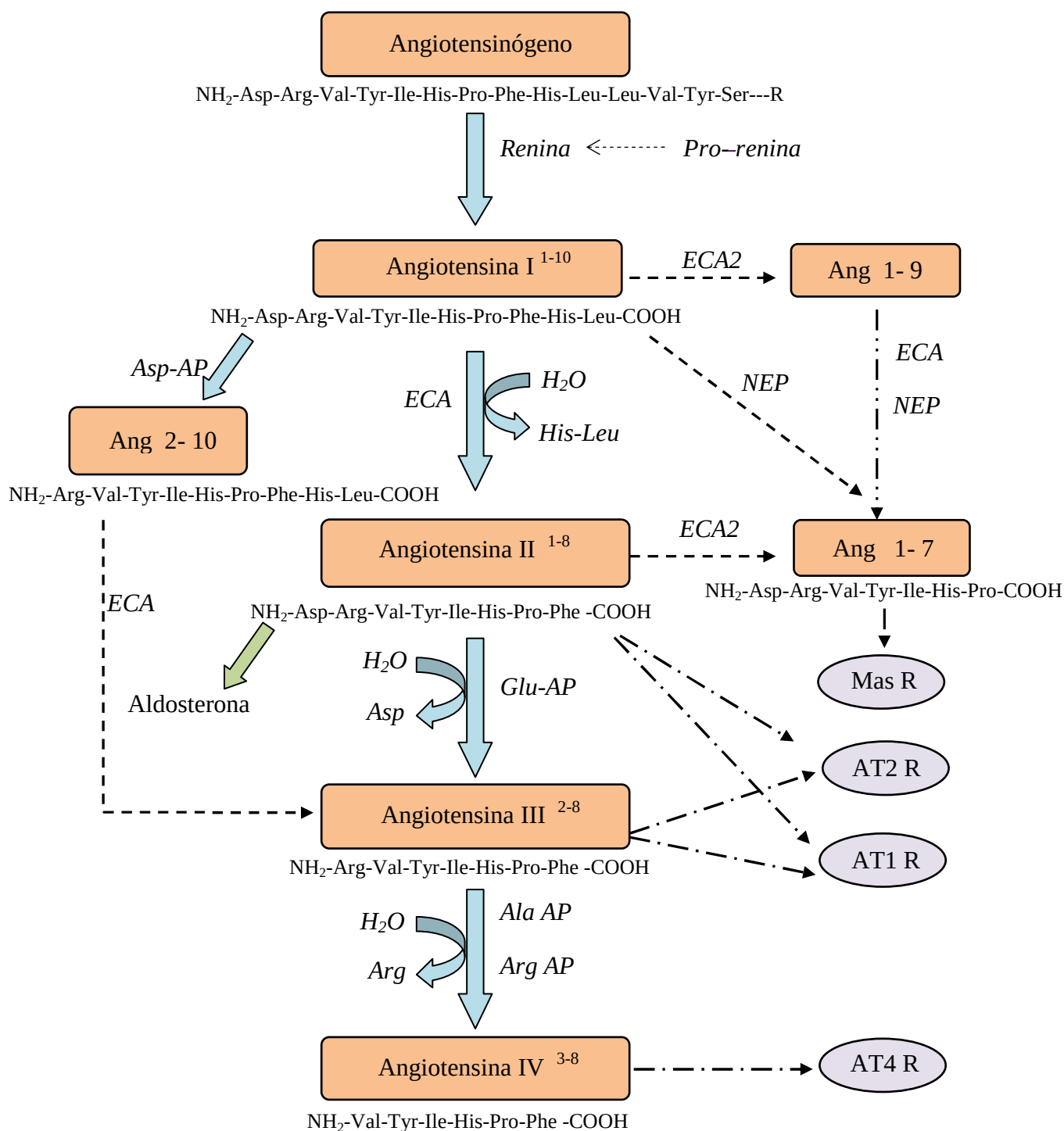
sistema es uno de los mecanismos vasoconstrictores más potentes del organismo, comenzando su actividad con la liberación de la renina desde el aparato yuxtaglomerular (Tamargo, 1996).

En el esquema clásico del SRAA, la renina procedente del riñón se libera a la circulación sanguínea donde actúa sobre el angiotensinógeno, una alfa globulina sintetizada por el hígado. La reacción enzimática da origen a un decapeptido, la angiotensina I (Ang I), que es muy inestable, siendo desdoblado rápidamente por el enzima convertidor de angiotensina (ECA) dando origen al primer péptido activo del sistema, la Ang II. El ECA, al igual que la renina, puede ser localizado en distintos tejidos, aunque el principal sitio de formación es el endotelio de los capilares pulmonares. Se sabe que la vida media de la Ang II (octapéptido activo) es también muy breve, al igual que su efecto vasoconstrictor directo, ya que es degradada rápidamente por enzimas proteolíticos (aminopeptidasas) pasando a péptidos de menor peso molecular, uno de ellos el heptapéptido angiotensina III (Ang III) (Tamargo, 1996; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La Ang II interactúa con los receptores AT1 y AT2 para producir sus efectos. La Ang II es capaz de inducir y estimular la síntesis y liberación de aldosterona. Pero no solamente es la Ang II, sino toda una familia de angiotensinas (angiotensina II, III, IV, Ang 1-7, Ang 2-10) las que ejercen los efectos característicos que son atribuidos al sistema. Estos efectos están mediados a través de la estimulación de los receptores AT1, AT2, AT4 y Mas (De Gasparo et al., 1990; De Gasparo et al., 2000; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Por otra parte, recientemente se ha descubierto una proteína que se une y activa a la renina, la pro-renina. El papel fisiológico de estos nuevos componentes del SRAA no está completamente resuelto, pero es probable que ejerzan un impacto considerable en la acción local de la Ang II y en los efectos que este sistema tiene en distintos tejidos del organismo. Todo ello hace que el SRAA siga siendo un importante objetivo terapéutico para las ECV y renales (Kobori et al., 2007; Bader y Ganten., 2008).

Cascada del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona



Esquema 1. El principal péptido activo es la angiotensina II, pero la renina, ECA y angiotensinógeno, son los elementos indispensables para originar la angiotensina II. AT2 R, receptor angiotensina tipo 2; AT1 R, receptor angiotensina tipo 1; AT4 R, receptor angiotensina tipo 4; Mas R, receptor Mas; Asp AP, aspartil aminopeptidasa; Glu AP, glutamil aminopeptidasa; Arg Ap, arginil aminopeptidasa; ECA, enzima convertidor de angiotensina; NEP, endopéptidasa neutral; ECA 2, enzima convertidor de angiotensina 2; (Banegas et al., 2008; Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

1.3.1. ENZIMAS PROCESADORAS Y PÉPTIDOS DEL SISTEMA

Renina

El descubrimiento de la Renina por el fisiólogo Robert Tigerstedt y su estudiante Per Bergmon en 1898 se basó en experimentos realizados entre 1896-1897 en el instituto Karolinska. Con extractos salinos de riñón de conejo, se demostró como éstos poco a poco aumentaba la PA cuando se inyectaban en conejos. La principal causa de esta acción estaba presente en la corteza renal, pero no en la médula. Los autores concluyeron que la sustancia implicada era una proteína, y se le llamo renina. Se especuló que la renina podría de alguna manera, directa o indirecta, asociarse también con la hipertrofia del corazón, la enfermedad renal y el aumento de la PA. Sin embargo, estos resultados no se pudieron reproducir, y no fue hasta finales de 1930 cuando se redescubrió la renina (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Estrictamente hablando, la renina no es una hormona, sin embargo, puede ser considerada como tal por su papel en la generación de Ang I, y también debido a que está sujeta a un estricto mecanismo de regulación. Por lo tanto, la concentración de renina plasmática, o su actividad, se utilizan a menudo como una medida de la actividad global del SRAA (Kobori et al., 2007).

La forma activa de la renina contiene de 339 a 343 residuos de aminoácidos, después de la ruptura proteolítica de los 43 residuos del extremo amino de la pro-renina. La renina activa circulante y la pro-renina son liberadas principalmente desde el riñón, pero también otros tejidos secretan pro-renina a la circulación (Kobori et al., 2007).

Los receptores de la renina son abundantes en el corazón, cerebro y placenta. Los niveles más bajos se encuentran en los riñones y en el hígado. El tejido adiposo visceral también expresa receptores de la renina, mientras el tejido adiposo subcutáneo expresa un menor número de receptores para la renina (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Catalogada como EC3.4.99.19, esta enzima es segregada por el riñón y se forma a partir de la pro-renina tanto en el plasma como en el propio riñón. Hidroliza el enlace Leu¹⁰-Leu¹¹ en el angiotensinógeno para generar la Ang I.

Es una proteína glicosilada de peso molecular entre 36 y 40 KDa, perteneciendo a la familia de las aspartil proteasas (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Tiene una vida

media aproximada de 80 minutos y su función principal consiste en separar el decapeptido Ang I del extremo amino terminal del angiotensinógeno.

La activación de la renina es el primer paso en la cascada del SRAA y la falta de esta enzima da lugar a la ausencia de Ang I. La síntesis y liberación depende de tres estímulos:

- Disminución del flujo renal a consecuencia de cambios en la PA.
- Disminución del contenido de sodio en el túbulo contorneado distal.
- Estimulación beta- adrenérgica.

Así mismo, la liberación de la renina es inhibida por la vasopresina, el potasio de la dieta y por retroalimentación negativa del propio sistema.

El desarrollo y uso de bloqueantes de los receptores de la renina constituye uno de los últimos avances terapéuticos con perspectivas interesantes en el tratamiento de la hipertensión y sus patologías asociadas (ver figura 6). En ratones, el bloqueo de estos receptores ofrece resultados prometedores en el tratamiento de la nefropatía diabética y en la prevención de glomerulopatía hipertensiva. Estos descubrimientos han cambiado profundamente nuestra visión de los receptores de la renina y la pro-renina como objetivos terapéuticos en humanos (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

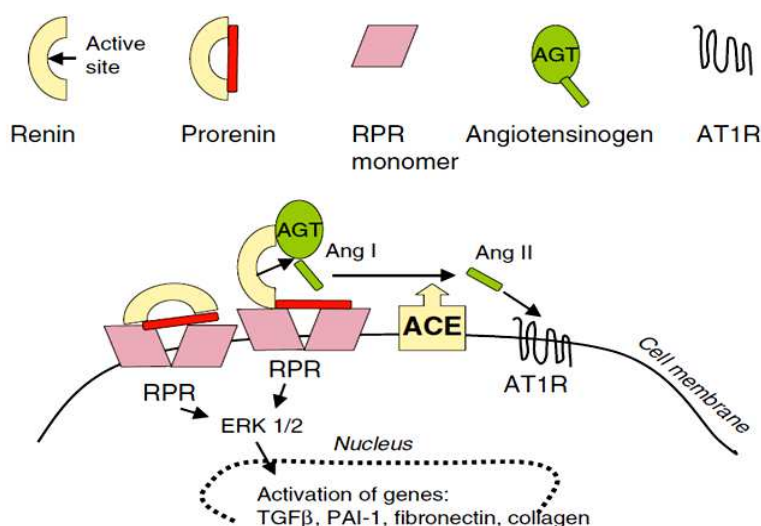


Figura 6. Representación esquemática de la interacción de la prorenina con los receptores renina/ prorenina (RPR, en forma dimérica). La unión al receptor conduce a la activación de pro-renina por el desplazamiento del segmento inactivo. La renina activa genera Ang I a partir del angiotensinógeno y el enzima convertidor de angiotensina (ECA) genera Ang II de Ang I. La Ang II puede activar los receptores AT1 de membrana (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008).

Angiotensinógeno

El angiotensinógeno es una glicoproteína, perteneciente a la familia de las alfa-globulinas. Da lugar a la Ang I, un decapeptido sin actividad fisiológica conocida, por la acción de la renina (ver esquema 1). La mayoría del angiotensinógeno circulante se produce y secreta por el hígado, aunque otros órganos como los riñones o el tejido adiposo blanco también producen angiotensinógeno (Kobori et al., 2007). Se ha postulado que cambios en la concentración de angiotensinógeno afectan al ritmo de formación de Ang I y Ang II, y por lo tanto provocan modificaciones de la PA (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

El angiotensinógeno también está presente en la orina, aunque su origen no es el angiotensinógeno circulante, sino el que se forma y secreta en los túbulos proximales de la nefrona. De hecho, la filtración glomerular de este péptido es limitada (Kobori et al., 2003). La formación de Ang I y Ang II en el lumen tubular con posterioridad a la secreción de angiotensinógeno puede ser posible debido a que la renina se filtra y/o es secretada por las células del aparato yuxtaglomerular. La identificación de renina en segmentos de la nefrona distal puede también ofrecer una posible vía para la generación de Ang I. El angiotensinógeno intacto en la orina indica su presencia a lo largo de toda la nefrona. La disponibilidad de sustrato apoya la conversión continua de Ang I y Ang II en los segmentos distales (Kobori et al., 2007). Una vez que el Ang I se forma, la conversión a AngII se produce fácilmente porque hay abundantes cantidades de ECA en el túbulo proximal (Figura 7).

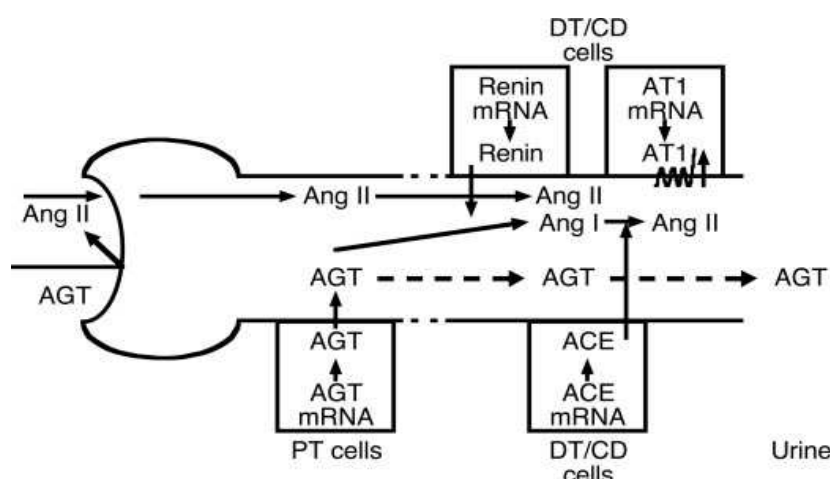


Figura 7. SRA intrarenal en segmentos de la nefrona proximal y distal. En la hipertensión arterial dependiente de AngII, un aumento de la secreción tubular proximal de angiotensinógeno aumenta la concentración de Ang II distal y sus efectos sobre la reabsorción tubular distal. AGT, angiotensinógeno, PT, túbulos proximales, DT, túbulos distales, CD, túbulos colectores (Kobori et al., 2007).

Angiotensina I (Ang 1-10)

La Ang I es un decapeptido que no tiene prácticamente actividad biológica por su rápida conversión a Ang II. Cuando el ECA está inhibido, puede ejercer acciones similares a la Ang II, pero muy inferiores en cuanto a su potencia (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Se ha observado que la Ang I es capaz de estimular la liberación de las catecolaminas de la médula adrenal e inducir sed (efecto dipsógeno), cuando se inyecta directamente en el sistema nervioso central (SNC) (Hertting y Meyer, 1974).

Enzima convertidor de Angiotensina (ECA)

El Enzima Convertidor de Angiotensina es una proteína de gran tamaño (EC 3.4.15.1; 1278 aminoácidos), que recibe diferentes nombres, como quinasa II o endopeptidasa, pero habitualmente se conoce por ECA. Es un enzima transmembrana, del tipo de las zinc metalopeptidasas. El importante papel que juega en la regulación de la PA y el metabolismo salino lo efectúa mediante la conversión de la Ang I a Ang II (ver esquema 1) (Kobori et al., 2007).

La Ang I, sin prácticamente actividad biológica, se convierte rápidamente en el efector principal de este sistema: la Ang II, por acción del ECA que se encuentra en las células endoteliales de muchos lechos vasculares (Kobori et al., 2007). El sitio donde se produce la mayor tasa de conversión a Ang II es el borde luminal endotelial del lecho vascular pulmonar, mientras que en el plasma la actividad del ECA es escasa.

El ECA humano se presenta en dos formas, una de peso molecular entre 150–180 KDa, conocida como el ECA somático y otra de bajo peso molecular (90–100 KDa) y localizada en el testículo, llamada ECA germinativa o testicular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Si bien ésta es la vía más importante para generar Ang II, existen caminos metabólicos alternativos que garantizan la formación de Ang II en ciertos estados, como por ejemplo durante el proceso de inhibición farmacológica del ECA (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

La localización del ECA en el riñón de varias especies ha sido bien caracterizada. Sin embargo, hay algunas diferencias importantes entre los seres

humanos y los animales de experimentación comúnmente utilizados. Los riñones humanos normales expresan predominantemente ECA en el borde en cepillo de los segmentos del túbulo proximal, mientras que la expresión del ECA se observa muy poco en las células endoteliales vasculares y no es detectable en la vasculatura del glomérulo o incluso en las membranas basolaterales de las células epiteliales. Por el contrario, se ha descrito una intensa actividad de ECA en las células endoteliales de casi toda la microvasculatura renal de ratas (Kobori et al., 2007).

La actividad del ECA está presente en el fluido tubular a lo largo de toda la nefrona, excepto durante los últimos años de vida, cuando parece encontrarse sólo en el túbulo distal. Se ha demostrado que la actividad del ECA es mayor en la porción inicial del túbulo proximal, se reduce en la nefrona distal y aumenta nuevamente en la orina. Este hecho sugiere que la secreción de ECA es proximal, y la degradación y/o reabsorción tiene lugar en los túbulos colectores. Por lo tanto, la Ang II puede formarse no sólo en el túbulo proximal, sino también más allá de la conexión de los túbulos (Figura 7). Así, la actividad renal de ECA es esencial para mantener en estado de equilibrio los niveles de Ang II en el riñón (Kobori et al., 2007).

Angiotensina II (Ang 1-8)

La Ang II es el principal péptido bioactivo del SRA. Se trata de un octapéptido de intensa acción vasoconstrictora y corta vida de aproximadamente un minuto. Este péptido juega un importante papel en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas (Kobori et al., 2007). Sus funciones principales son provocar la secreción de vasopresina, estimular la sensación de sed, efecto vasoconstrictor, estimular la secreción de aldosterona y favorecer la transmisión sináptica, además de ejercer su conocido efecto de elevación de la presión sanguínea por otros mecanismos (Touyz y Schiffrin, 2000). Por ejemplo, en el corazón la Ang II incrementa el flujo del calcio y la fuerza de contracción del músculo (Tamargo, 1996).

Existen diferencias interespecíficas debidas al aminoácido que está en la posición 5. La forma humana tiene isoleucina mientras que la forma bovina, que se emplea en clínica y experimentalmente, tiene valina en esta posición.

La Ang II desempeña un papel clave en la regulación de la homeostasis cardiovascular, regulando tanto la resistencia vascular como el volumen de sangre. El

amplio espectro de tejidos diana que presenta la Ang II incluye las glándulas suprarrenales, los riñones, el cerebro, la hipófisis, el músculo liso vascular, y el sistema nervioso simpático (SNS).

La Ang II es una hormona que se produce y actúa en la circulación, pero que también se forma localmente en muchos tejidos tales como el cerebro, el riñón, el corazón y los vasos sanguíneos. Esto ha llevado a sugerir que la Ang II también puede funcionar mediante mecanismos paracrinós y autocrinos, induciendo el crecimiento celular, la proliferación y el control de la formación de la matriz extracelular (De Gasparo et al., 2000).

El mecanismo de acción de la Ang II es muy similar al de la endotelina. Logra su acción mediante un aumento del Ca^{2+} en el citosol por la vía de la fosfolipasa C y de la proteína-quinasa, pero con la propiedad de activar a los proto-oncogenes; de ahí su efecto nocivo a nivel estructural a largo plazo. Lo anterior permite concluir que la Ang II es un mitógeno, disfrazado de vasoconstrictor.

La Ang II normalmente se une al receptor AT1, pero cuando este receptor es bloqueado, se une a los receptores AT2 los cuales son muy activos en la vida embrionaria, en el proceso de diferenciación y de vasculogénesis. Paradójicamente, la Ang II ligada a este receptor AT2 se vuelve vasodilatadora, antimitógena y antiproliferativa. Estos receptores también estimulan la producción del NO. En resumen, la Ang II puede ser perjudicial o benéfica, según el receptor al que se una (De Gasparo et al., 1994; De Gasparo, 2002).

Angiotensina III (Ang 2-8)

La Ang III se conoce desde la década de 1970 a causa de su efecto vasoconstrictor y de liberación de aldosterona. La Ang III se genera a partir de la Ang II por acción de la aminopeptidasa A (AP A o Glu-AP) (ver esquema 1). Este péptido ejerce sus acciones, en principio similares a las de Ang II, a través de los receptores AT1 y AT2 (De Gasparo et al., 2000; Banegas et al., 2008).

Mientras que la Ang II es considerada como el efector principal del SRAA, la Ang III puede ser igual o incluso más importante en algunas de las acciones mediadas por los receptores AT1, por ejemplo la liberación de vasopresina (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008), pero su vida media es tan corta que sus efectos globales son débiles.

En el organismo existen angiotensinasas que inactivan a la Ang II. Estas son peptidasas, como la aminopeptidasa A (APA, EC 3.4.11.7), una zinc metalopeptidasa que ha adquirido relevancia fisiológica ya que es la principal enzima responsable de la formación de Ang III. Esta aminopeptidasa (AP) rompe el enlace peptídico entre los aminoácidos Asp-1 y Arg-2 y convierte a la Ang II en Ang III. De esta forma, la Ang III es el primer metabolito de la Ang-II (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008).

La inhibición central, pero no periférica, de esta AP A provoca un descenso de la PA. Esta observación ha despertado el interés por encontrar un inhibidor selectivo de la enzima para el tratamiento de la HTA, que pueda atravesar la barrera hemato-encefálica y actúe a nivel central (Réaux et al., 2001).

Angiotensina IV (Ang 3-8)

La Ang IV se genera a partir de la Ang III por la AP M (ver esquema 1), que rompe el enlace entre Arg-1 y Val-2 de la Ang III. Este péptido biológicamente activo ha alcanzado un interés creciente a raíz del descubrimiento y la clonación de unos receptores con actividad aminopeptidasa y que son regulados por la insulina (IRAP/AT4), con gran afinidad por el péptido Ang IV (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008). Las acciones de la Ang IV mediadas por IRAP incluyen vasodilatación renal así como hipertrofia y activación de NF- κ B que conduce a una mayor expresión del activador de plaquetas. Varios estudios indican que la Ang IV tiene importantes funciones reguladoras en el metabolismo renal y el daño cardiovascular (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). La Ang IV regula el crecimiento celular de los fibroblastos cardíacos, las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares. Parece que la Ang IV está implicada en la respuesta vascular inflamatoria, y por lo tanto podría desempeñar un importante papel en la fisiopatología cardiovascular.

Se ha demostrado que la Ang IV inhibe in vitro la actividad del ECA, sugiriendo una participación importante en la autorregulación del SRAA (Fruitier et al., 2002). La Ang IV tiene un papel importante en la regulación de los flujos sanguíneos locales, incluido el cerebral, pero también se le ha asignado un papel en procesos cognitivos, estrés, ansiedad y depresión (Banegas et al., 2008).

La producción de la Ang IV parece tener un papel importante a nivel tisular pero no en plasma. Esta angiotensina puede actuar uniéndose a los receptores AT1 y AT2 de

la Ang II, aunque su receptor de unión específico es el AT₄ que se localiza mayoritariamente en cerebro y riñón (Ramírez et al., 2008).

Angiotensina (1-7)

Durante mucho tiempo se pensó que el péptido Ang (1-7) carecía de efectos biológicos, pero desde hace unos años han ido apareciendo numerosos trabajos que demuestran la existencia de tales efectos (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Esta angiotensina se forma a través de un mecanismo enzimático independiente del ECA (ver esquema 1). Se puede generar a partir de la Ang I por medio de la timetoligo-peptidasa (E.C. 3.4.24.15) en las células musculares lisas vasculares (CMLV); por medio de la endopeptidasa neutra (NEP 3.4.24.11) en células endoteliales (CE); y de la prolil endopeptidasa (E.C. 3.4.24.26) en el cerebro canino y en células vasculares de la aorta y venas umbilicales. También, se genera a partir de Ang II o de Ang I por el ECA₂, aunque la conversión a partir de Ang II es mucho más eficiente (500 veces). Por otro lado, la Ang (1-7) se forma en la circulación a partir de Ang I por una vía independiente de la generación de Ang II. Se genera a partir de Ang (1-9) por medio del ECA y la neprilisina (Ferrario, 2006).

Ya en 1988 se había demostrado que la Ang (1-7) era tan eficaz como la Ang II para producir la liberación de la vasopresina (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). También se sabe que la Ang (1-7) puede contrarrestar varias de las acciones de la Ang II, al parecer porque la Ang (1-7) se une al receptor que media las acciones vasodilatadoras y antiproliferativas del heptapéptido (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Las acciones de la Ang (1-7) son principalmente vasodilatadoras y antitróficas (inhibición de síntesis proteica). Interviene en la regulación de la PA y posee efectos antiproliferativos. Aunque las evidencias indican que la Ang (1-7) actúa como vasodilatador, los inhibidores selectivos de los receptores AT₁ y AT₂ no alteran la vasodilatación inducida por este péptido. El efecto vasodilatador podría estar mediado por un aumento de la síntesis de bradiquinina, quien a su vez estimula la liberación de vasopresina, óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (Deddis et al., 1998).

Los efectos de este péptido tiene lugar tras su unión al receptor Mas, un receptor acoplado a la proteína G y codificado por un protooncogen (Santos et al., 2003).

Enzima convertidor de Angiotensina 2 (ECA2)

El Enzima Convertidor de Angiotensina 2 (ECA2) ha sido descubierto más recientemente. Este descubrimiento ha convertido tanto al ECA2 como a su producto principal, la Ang (1-7), en el foco de una intensa actividad investigadora. El ECA2 es una carboxipeptidasa que hidroliza el residuo carboxilo terminal de la Ang I, transformándola en Ang (1-9), que posteriormente es convertida en Ang (1-7) por el ECA (ver esquema 1) (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

El ECA2 es particularmente abundante en el endotelio vascular del riñón, corazón, el hipotálamo y la pared aórtica. El ECA2 también se encuentra en los testículos (Santos y Ferreira, 2007). La regulación de la expresión del ECA2 aún no ha sido totalmente aclarada. Ni los inhibidores del ECA (IECA) ni los bloqueantes del receptor AT1 (ARA II AT1) inhiben la actividad de ECA2, pero ambos parecen regular al alza la expresión de este enzima en el miocardio y en la corteza renal de ratas. La expresión del ECA2 en el corazón también aumenta en los infartos de miocardio (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Se ha demostrado que el ECA2 tiene efectos directos sobre la función cardiaca, desempeñando de esta forma un papel protector del sistema cardiovascular. La delección del gen que codifica el ECA2 en ratones ocasiona fallos severos en la contractilidad cardiaca y aumenta los niveles plasmáticos de Ang II, lo que parece indicar un importante papel en la regulación de la función cardiaca (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008). Además, se piensa que puede intervenir en la fisiopatología de distintas enfermedades renales (Crackower et al., 2002).

Aldosterona

La Aldosterona es una hormona mineralocorticoide sintetizada en la zona glomerular de la corteza suprarrenal, y es parte del complejo mecanismo utilizado por el organismo para regular la presión sanguínea. Su síntesis está controlada fundamentalmente por la Ang II. Afecta a la homeostasis electrolítica por aumento de la reabsorción de sodio y excreción de potasio en el túbulo distal. Debido a su relación con la Ang II, los niveles de aldosterona están íntimamente relacionados con el SRAA. Es por ello que existe una relación positiva entre la actividad plasmática de renina (o niveles de Ang II) y los niveles de aldosterona, y negativa entre la excreción urinaria de

sodio y la aldosterona. La aldosterona es el principal esteroide en la regulación de las concentraciones de potasio, y juega un papel esencial en el mantenimiento del volumen sanguíneo y de la PA (Cruz et al., 2004).

La aldosterona actúa principalmente en el epitelio de los riñones, glándulas salivales y colon. Además, tiene receptores de gran afinidad que se encuentran en el hígado, cerebro, hipófisis y en los monocitos (Hurwitz et al., 2004).

La producción de aldosterona es regulada por varios factores, algunos de los cuales estimulan la producción y otros la inhiben. Entre los factores que estimulan su producción se incluyen la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la concentración de potasio en el plasma y el SRA (Hurwitz et al., 2004). El exceso de aldosterona tiene varios efectos perjudiciales para la salud (Figura 8): pérdida de magnesio y potasio por aumento de la excreción urinaria del mismo, retención de sodio; potenciación de las catecolaminas; inducción de arritmias ventriculares, inducción de hipertrofia y fibrosis miocárdica, vasculopatía por disfunción endotelial con aumento de retención de Na^+ por las CMLV, mayor generación de radicales libres, hipertrofia de CMLV, estimulación de la síntesis de $\text{TGF}\beta$ -1 y aumento de los receptores para Ang II, aumento de la síntesis de PAI-1 e inhibición de la fibrinólisis, atenuación de los barorreflejos y desarrollo de nefroesclerosis maligna. Además, la aldosterona causa retención de Na^+ y eleva la PA. La aldosterona eleva específicamente los niveles de AMPc en las CMLV y fosforila la CREB (cAMP-response elements binding protein) (Ikeda et al., 1991; McMahon, 2001).

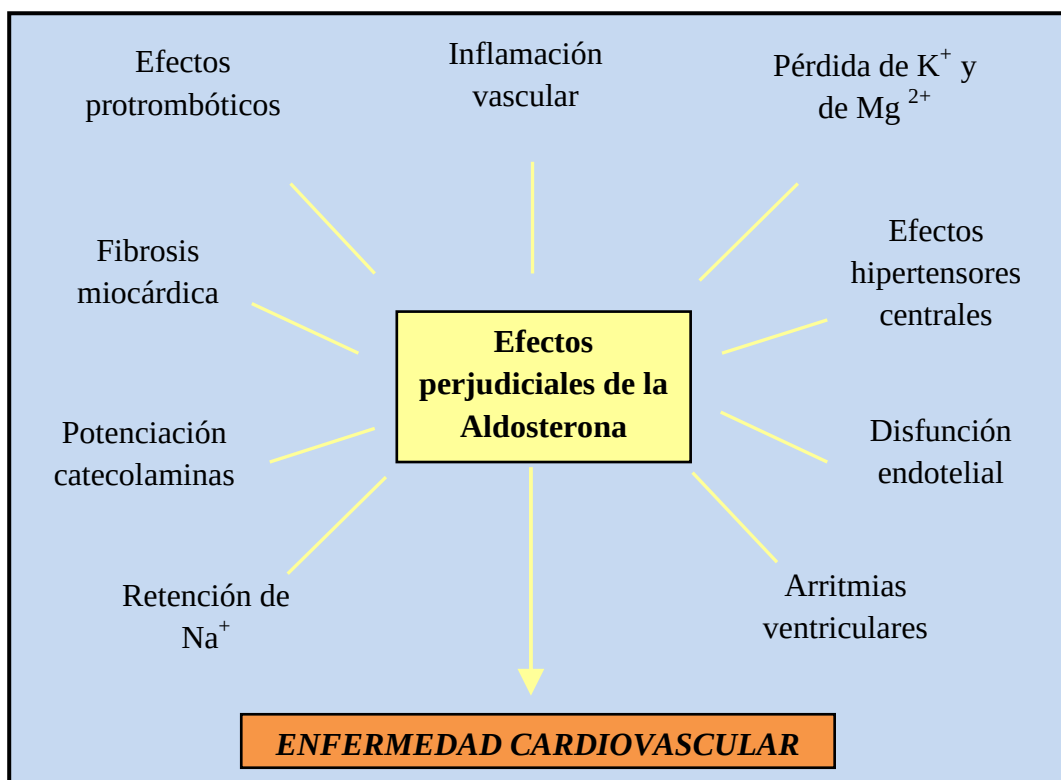


Figura 8. Efectos perjudiciales de la aldosterona (McMahon, 2001).

1.3.2. RECEPTORES DE LAS ANGIOTENSINAS

Los efectos fisiológicos de la Ang II se desencadenan por su unión a receptores específicos en las membranas celulares. A pesar de que se han descrito una gran variedad de receptores para las acciones de la Ang II, solamente los receptores de tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2) han sido clonados y caracterizados (De Gasparo et al., 1994).

Los receptores AT1 y AT2 son polipéptidos que contienen aproximadamente 360 aminoácidos que atraviesan la membrana celular 7 veces, existiendo homología de su secuencia tan solo en un 30%. El gen para el receptor AT1 está localizado en el cromosoma 3 mientras que el gen para el receptor AT2 está en el cromosoma X (Vázquez et al., 1998).

El AT1 se encuentra ampliamente distribuido en tejidos periféricos y cerebro, siendo el mediador más importante de las funciones vasoconstrictoras de la Ang II. El receptor AT1 pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a la proteína G y a sistemas de segundos mensajeros. La inhibición de la adenilato ciclasa a través de la proteína G reduce la concentración de AMP cíclico y

activa a la fosfolipasa D, A2 y C, lo cual resulta en la generación de eicosanoides y en la activación de la vía del fosfoinositol, respectivamente. El resultado final de esta activación es el aumento intracelular de calcio y la activación de la proteína quinasa C, lo cual se asocia con la generación de factores transcripcionales asociados con el crecimiento (FTC) (Vázquez et al., 1998; Stroth y Unger, 1999).

El receptor AT2 se expresa en forma abundante en los tejidos fetales y en adrenales, páncreas, útero, corazón, cerebro y endotelio vascular, en adultos. El AT2 pertenece a la misma familia de receptores que el AT1. Con respecto a las funciones mediadas por los receptores AT2, estas parecen tener efectos opuestos que contrarrestan los mediados por los receptores AT1, por ejemplo: vasodilatación, liberación de NO y la inhibición de la proliferación y el crecimiento. Sin embargo, los receptores AT2 también pueden mediar efectos neurotróficos en el sistema nervioso central y pueden ejercer un papel protector contra la isquemia (Vázquez et al., 1998; Stroth y Unger, 1999).

En el riñón de rata, la Ang III pero no la Ang II, induce natriuresis mediada por los receptores AT2. Esta natriuresis es aumentada por la inhibición de la aminopeptidasa N, un enzima que metaboliza la Ang III a Ang IV, lo que indica que los inhibidores de la aminopeptidasa N podrían ser desarrollados como fármacos para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la retención de sodio y líquido, tales como la hipertensión y la insuficiencia cardiaca (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Los efectos beneficiosos de dichos inhibidores incluyen aumentos en las concentraciones de bradicinina y NO, con efectos vasodilatadores y natriuréticos, así como efectos antifibróticos. Los efectos potencialmente perjudiciales incluyen un aumento de la apoptosis, mayor expresión del factor nuclear kappa B (NF-κB) e inducción de las quimioquinas (Fyhrquist y Saijonmaa, 2008).

Mediante técnicas de biología molecular, se ha comprobado la existencia de dos subtipos en el receptor AT1: el AT1_A y el AT1_B, que se diferencian en la secuencia de aminoácidos de la zona C-terminal de su estructura molecular (De Gasparo et al., 2000). El receptor AT1_A está altamente expresado en hígado, riñón, aorta, útero, ovario, bazo, pulmón y cerebro. El receptor AT1_B se expresa en la hipófisis, glándula adrenal, riñón, útero e hígado, y está ausente en el corazón, cerebro y bazo (Escalante, 2004).

La importancia funcional de los receptores AT2 queda de manifiesto al comprobar el efecto vasodilatador de la Ang II, que se produce al bloquear el receptor AT1 (que media los efectos vasoconstrictores de la Ang II). Los efectos biológicos de la Ang II se encuentran balanceados por una activación dual de vasoconstricción y vasodilatación a través de estos dos receptores. Así pues, en el sistema cardiovascular el efecto vasopresor de la Ang II está acoplado al receptor AT1 mientras que el efecto depresor está acoplado al receptor AT2. Aún más, existen estudios que demuestran que el efecto biológico de la activación del receptor AT2 está asociado a la síntesis del óxido nítrico (De Gasparo et al., 2000).

También se han descrito receptores AT3 y AT4 y, aunque es mucho menos lo que se conoce de ellos. Se sabe que los receptores AT3 presentan baja afinidad por el losartán y alta afinidad por la saralasina, y su activación se ve asociada a la formación de GMPc dependiente del óxido nítrico. Los receptores AT4, parecen estar implicados en el flujo sanguíneo cerebral y de la corteza renal (De Gasparo et al., 2000).

El receptor AT4 se definió originalmente como el sitio de unión específico para la Ang IV (De Gasparo et al., 2000). La administración central de Ang IV, y de algunos de sus análogos como la LVV-hemorfinina 7, incrementa notablemente la capacidad de aprendizaje y la memoria en roedores, y es capaz de revertir los déficits de memoria en modelos de amnesia. Este receptor está distribuido ampliamente en todo tipo de tejidos, incluyendo las glándulas adrenales, los riñones, el pulmón y el corazón. En los riñones, la activación del receptor AT4 incrementa el flujo cortical y disminuye el transporte de Na^+ en túbulo proximales aislados. Posteriormente, el receptor AT4 fue identificado como el enzima de membrana: aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), una proteína trans-membrana de tipo II, perteneciente a la familia de las aminopeptidasas de tipo M1, la cual se localiza en vesículas intracelulares junto con el transportador GluT4 en las células sensibles a la insulina (Chai et al., 2004).

Tres hipótesis distintas se han lanzado para explicar el posible efecto de la estimulación del receptor AT4 sobre la memoria: su acción inhibitoria sobre la actividad enzimática IRAP, prolongando la acción de sus péptidos sustrato; su efecto modulador del transporte de glucosa mediante los GluT4; o su actividad como receptor (AT4) que podría activar a distintas proteínas intra-citoplasmáticas responsables de sus efectos (Chai et al., 2004).

Como ya hemos comentado anteriormente, desde hace tiempo sabemos que la AngII no es el único péptido activo del RAS. Entre los péptidos con actividad biológica de este sistema, la AngII y la AngIII ejercen sus efectos mediante la unión a los receptores AT1 y AT2, mientras que la Ang IV se une de forma específica al receptor AT4.

Estudios llevados a cabo con antagonistas selectivos (Fontes et al., 1994; Santos y Campagnole-Santos, 1994) han puesto de manifiesto que otro de los péptidos activos del RAS, la Ang 1-7, lleva a cabo sus acciones a través de un receptor distinto a los AT1 y AT2 (Santos y Campagnole-Santos, 1994). El protooncogen MAS fue detectado por primera vez *in vivo* debido a sus propiedades pro-tumorales (Young et al., 1986; Rabin et al., 1987). Este protooncogen codifica una proteína con siete dominios transmembrana hidrofóbicos, y se considera que forma parte de la familia de receptores acoplados a la proteína G (Zohn et al., 1998).

Los primeros estudios de transfección realizados indicaron que el gen MAS podría codificar un receptor para la AngII. Además, el receptor MAS y el AT1 parecían estar relacionados, ya que los incrementos en la concentración celular de Ca^{2+} en las células transfectadas con MAS sólo ocurren cuando dichas células también expresan el receptor AT1 (Ambroz et al., 1991). Otros experimentos parecían indicar que el receptor MAS modulaba las señales intracelulares generadas por la unión de la AngII al AT1 (Von Bohlen und Halbach et al., 2000).

Santos et al. (2003) demostraron que el receptor MAS es capaz de unirse también a la Ang 1-7, siendo responsable de las acciones biológicas de este heptapéptido, muchas de las cuales contrarrestan los efectos de la AngII. La unión de la Ang1-7 al receptor MAS estimula la liberación de NO y prostaglandinas, provocando vasodilatación e inhibición del crecimiento celular (Sampaio et al., 2007), efectos que tendrían como consecuencia una mejora de la función endotelial. De hecho, en las aortas de los ratones MAS-Knockout no se ejerce el efecto vasodilatador de la Ang 1-7 (Santos et al., 2003). La estimulación de la liberación de NO por la Ang 1-7, mediada por el receptor MAS, no se acompaña de una modificación en la concentración de calcio intracelular, lo que sugiere la participación de una vía de señalización no dependiente del calcio (Heitsch et al., 2001).

Por otro lado, uno de los mecanismos más importantes a través del cual el SRA modula la función vascular es mediante la regulación del estado redox. En este sentido,

la AngII actúa como un factor pro-oxidante, ya que aumenta la producción del anión superóxido mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa. Por el contrario, la Ang 1-7 mediante su unión al receptor MAS y el aumento en la liberación de NO es capaz de contrarrestar los efectos pro-oxidantes de la AngII (Rabelo et al., 2011).

Los datos disponibles hasta la fecha señalan al receptor MAS y al péptido Ang 1-7 como importantes moduladores de los efectos perjudiciales ejercidos por la AngII a través del receptor AT1.

1.4. AMINOPEPTIDASAS E HIPERTENSIÓN ARTERIAL

1.4.1. AMINOPEPTIDASAS

Clasificación y Nomenclatura

Las aminopeptidasas (APs) constituyen un grupo de enzimas muy heterogéneo, con una amplia distribución tanto en el reino animal como vegetal. Se localizan principalmente unidas a la membrana plasmática externa (ectoenzimas), pero también las hay solubles en plasma y otros fluidos, citosólicas y en diferentes organelas celulares (Ramírez et al., 2008; Banegas et al., 2008).

La clasificación de este grupo es bastante compleja debido a la gran heterogeneidad de sus integrantes. Por su actividad hidrolítica pertenecen a la clase 3 según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología molecular (IUBMB), y a la subclase 3.4 porque engloba a todas las hidrolasas de péptidos. Como su nombre indica, llevan a cabo la hidrólisis de aminoácidos concretos del extremo amino terminal de proteínas y sustratos peptídicos. La gran mayoría presentan la nomenclatura EC 3.4.11 y 3.4.14. Sin embargo existen otras clasificaciones, y según la bibliografía consultada una misma enzima puede presentar diferentes nombres. Se pueden clasificar por el número de aminoácidos que eliminan del extremo amino terminal de sus sustratos (dipeptidasas, tripeptidasas...); por la localización (soluble, de membrana, citosólica...); por su susceptibilidad a la inhibición por amastatina u otros inhibidores; por su ión metal y/o residuos que se unen al metal de la enzima (metaloenzimas de zinc) y por el pH en el que desarrollan su actividad máxima (Taylor, 1993).

La siguiente tabla muestra las aminopeptidasas más importantes en mamíferos (ver tabla 4). Se ha elaborado, en su mayor parte, según la información recogida en la base de datos BRENDA (www.brenda-enzymes.info). Esta base de datos, fue creada en 1987 por el Centro Alemán de Investigación Nacional para Biotecnología, en Braunschweig, y actualmente continúa su mantenimiento y actualización el International Union of Biochemistry and Molecular Biology (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/).

Número EC	Nombre AP=aminopeptidasa	Nombres Alternativos	Clase de Proteinasa	Localización Celular
3.4.11.1	Leucina AP citosólica	Citosol AP Catepsina III	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol
3.4.11.2	Alanina AP de membrana	APN, APM, CD13	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana
3.4.11.3	Cisteína AP	Oxitocinasa Vasopresinasa IRAP P-LAP Receptor de Ang IV	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana
3.4.11.4	Tripéptido AP	Tripeptidasa enzima que degrada CCK	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol
3.4.11.5	Prolina AP		Activada por Mn ²⁺	Citosol
3.4.11.6	Arginina AP	APB	Activada por tiol, Cl ⁻	Citosol Membrana
3.4.11.7	Glutámico AP	APA, angiotensina A	Metalo (Zn ²⁺) Activada por Ca ²⁺	Membrana
3.4.11.9	Xaa-Pro AP	APP	Activada por Mn ²⁺	Citosol Membrana
3.4.11.14	Alanina AP citosólica	Aminopeptidas III, PSA	Metalo(Zn ²⁺) Activada por Co ²⁺	Citosol
3.4.11.16	Xaa-Trp AP	APW	Metalo(Zn ²⁺)	Membrana
3.4.11.18	Metionina AP			Membrana
3.4.11.21	Aspártico AP	APX	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol Membrana
3.4.14.1	Dipeptidil peptidasa I	Catepsina C o J		Membrana Lisosoma
3.4.14.2	Dipeptidil peptidasa II	Dipeptidil AP II		Lisosoma

Número EC	Nombre AP=aminopeptidasa	Nombres Alternativos	Clase de Proteinasa	Localización Celular
3.4.14.4	Dipeptidil peptidasa III	Dipeptidil AP III, encefalinasa B		Citosol Membrana
3.4.14.5	Dipeptidil peptidasa IV	Dipeptidil AP IV	Serina	Membrana
3.4.14.9	Tripeptidil peptidasa I	Tripeptidil AP		Lisosoma
3.4.14.10	Tripeptidil peptidasa II	Tripeptidil AP II		Citosol
3.3.2.6	Leucotrieno – A4 hidrolasa	LTA 4 hidrolasa		Citosol
	APO			Citosol Nucleolo
	APQ	Laeveryna		Membrana
	Leucina AP derivada de adipocito	A-LAP/PILSAP	Metalo (Zn ²⁺)	Citosol Retículo endoplásmico
	AP derivada de Leucocito	L-RAP	Activada por tiol, Cl ⁻	Retículo endoplásmico
	Ectoenzima que degrada TRH	TRH-DE	Metalo (Zn ²⁺)	Membrana

Tabla 4. Clasificación de las principales aminopeptidasas en mamífero (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/).

Como hemos indicado anteriormente, las APs se identifican con diferentes nombres y la terminología es poco clara, pudiendo inducir a confusión (Banegas et al., 2008). La aminopeptidasa A (EC 3.4.11.7) hidroliza aminoácidos ácidos del extremo N-amino terminal (Mizutani et al., 2008), principalmente los residuos de glutámico, pero también es capaz de reconocer los terminales de aspártico, por lo que a esta enzima también se le ha llamado glutámico aminopeptidasa (Glu-AP) (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008). La enzima aspártico aminopeptidasa (EC 3.4.11.21) (Asp-AP), se consideró en un principio como un nombre alternativo para la Glu-AP, aunque actualmente se considera una nueva aminopeptidasa que actúa preferentemente también sobre residuos ácidos del extremo N-terminal, pero sabemos que es un enzima distinto de la Glu-AP (Banegas et al., 2006; Ramírez et al., 2008). La aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2) tiene preferencia por los aminoácidos neutros (Danziger, 2008), principalmente la alanina, por la que también se la denomina alanina aminopeptidasa (Ala-AP), sin embargo, también es conocida como aminopeptidasa M, ya que está muy

relacionada con la fracción de membrana microsomal del riñón de cerdo, a partir de la cual se purificó (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008).

La cisteína aminopeptidasa (EC 3.4.11.3) (Cys-AP) hidroliza la cisteína N-terminal adyacente a los residuos de tirosina de la oxitocina o vasopresina, y en consecuencia, ha sido denominada como oxitocinasa o vasopresinasa (Banegas et al., 2006; Tsujimoto et al., 2008; Banegas et al., 2008). La aminopeptidasa reguladora de la insulina (IRAP) es homóloga a la Cys-AP.

Como hemos indicado anteriormente, el receptor de Ang IV (AT4) es la enzima IRAP/Cys-AP/oxitocinasa. Sin embargo esta afirmación recientemente ha sido discutida, y se ha propuesto que la identidad del receptor AT4 se correspondería más bien con la del receptor de tipo I de la tirosinasa c-Met. (Banegas et al., 2008). Sin embargo, hay que recordar que no es un receptor en el sentido real de la palabra, ya que no hay pruebas de su acoplamiento a segundos mensajeros, aunque sin duda es una aminopeptidasa, debido a su capacidad de hidrolizar péptidos de angiotensina.

Todas las enzimas mencionadas anteriormente también se conocen bajo el nombre general de angiotensinasas, debido a que son capaces de hidrolizar angiotensinas (Ang) (Banegas et al., 2008). Su regulación es un tema aún controvertido y se han propuesto múltiples mecanismos que implican factores tanto endógenos como exógenos (Ramírez et al., 2008).

Antes de continuar hay que destacar que, como la nomenclatura de estas enzimas es muy variada y no está del todo normalizada, con el fin de evitar confusiones, en este texto se va a seguir la nomenclatura que identifica a las aminopeptidasas por el aminoácido N- terminal que hidrolizan preferentemente.

Localización y distribución

A nivel celular, la gran mayoría son proteínas de membrana. Su localización es muy amplia, encontrándose en el SNC y en tejidos y órganos periféricos, principalmente en riñón, intestino, hígado, pulmón, placenta, corazón y sangre (Banegas et al., 2008). También las hay solubles, en citosol, o segregadas al líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma. Son en su mayoría metaloenzimas dependientes de Zinc.

La actividad aminopeptidasa desempeña un papel importante en el metabolismo de péptidos circulantes y locales involucrados en el control de la PA y el balance hídrico (BH). De esta manera, las angiotensinasas, son peptidasas que generan péptidos activos o inactivos a partir de las angiotensinas, alterando las relaciones entre sus distintas formas bioactivas (Prieto et al., 2003; Banegas et al., 2006).

En los párrafos siguientes se resume la distribución de aquellas aminopeptidasas que van a ser objeto de estudio en este trabajo de investigación.

Cisteína Aminopeptidasa (EC 3.4.11.3)

La cisteína aminopeptidasa (Cys-AP) es también conocida como aminopeptidasa de membrana regulada por insulina (IRAP), oxitocinasa o vasopresinasa, es una enzima que en los humanos está codificada por el gen LNPEP (Albiston et al., 2003).

La IRAP se identificó originalmente en el tejido adiposo blanco y células musculares como una proteína principal en vesículas intracelulares que también albergan el transportador de glucosa sensible a la insulina GluT4. Tanto la IRAP como el GluT4, en su mayoría se localizan en estas vesículas intracelulares en condiciones basales (Keller, 2003).

Muchos investigadores han estudiado esta enzima debido a la capacidad que presenta para degradar la oxitocina. Se encuentra mayoritariamente en el suero de las mujeres embarazadas, incrementándose notablemente durante el primer trimestre del embarazo (Matsumoto et al., 2001). Es una AP con especificidad por las uniones peptídicas entre la cisteína N-terminal y el residuo de tirosina adyacente de la oxitocina o vasopresina. Se ha localizado en el plasma de las mujeres embarazadas y en la placenta humana, sin embargo, el suero fetal y el líquido amniótico están libres de esta actividad enzimática. Sólo se puede detectar una pequeña cantidad de enzima en sangre de mujeres no embarazadas, y nada en sangre de hombres (Keller, 2003).

La proteína puede ser secretada en el suero materno, y al encontrarse en las vesículas intracelulares junto con los transportadores de glucosa GluT4, principalmente en adipocitos y células de músculo esquelético, su secreción depende de la insulina. También puede encontrarse incluida en las membranas como una glicoproteína integral de membrana tipo II (Tsujimoto y Hattori, 2005).

Alanina Aminopeptidasa (EC 3.4.11.2)

Este enzima fue denominado en principio AP M debido a su localización en la membrana, es una proteína integral de membrana tipo II, lo que refleja su firme asociación con la fracción de membrana del riñón de cerdo, a partir de la cual fue purificado. Hoy en día aún se puede encontrar ocasionalmente esta nomenclatura en la bibliografía. Pero debido a que habitualmente era confundido con la leucina aminopeptidasa citosólica, a causa de la coincidencia en el sustrato específico y su similar distribución tisular, para diferenciarlos se sugirió que se podría renombrar como AP N, aludiendo a su preferencia de acción sobre los aminoácidos neutros.

La Ala-AP se encuentra en la membrana microvillar intestinal y renal, y también en las membranas plasmáticas de otros tipos de células. En el intestino delgado la Ala-AP interviene en la digestión final de los péptidos generados a partir de la hidrólisis de proteínas por proteasas gástricas y pancreáticas. Su función en las células tubulares proximales epiteliales y otros tipos celulares es menos clara. El gran dominio carboxiterminal extracelular contiene la secuencia característica de la superfamilia de las metaloproteinasas, a la cual se une el Zinc. La comparación de las secuencias de la Ala-AP y el Cluster de Diferenciación CD13 demuestran que son la misma proteína (Look et al., 1989).

La Ala-AP tiene un peso molecular de 160 kDa y contiene un átomo de Zn^{2+} en su molécula. Cada subunidad se compone de 967 aminoácidos, incluyendo un pequeño resto (8-10 aminoácidos) N-terminal incluido en el citosol, una transmembrana helicoidal que abarca el dominio extracelular y un extremo C-terminal. La secuencia de aminoácidos de la Ala-AP está altamente conservada en las especies de conejo, rata y humanos (Look et al., 1989).

Es una proteína muy glicosilada in vivo, y la única asparagina de la cadena contiene una serie de residuos de N-acetilglucosamina. Una forma soluble se ha detectado en el plasma y en la orina (Funakawa et al., 1987).

La Ala-AP se une preferentemente a los aminoácidos neutros del amino terminal de oligopéptidos. En los sistemas biológicos, los sustratos primarios de este enzima incluyen neuropéptidos como Met- y Leu-encefalina y las endorfinas. Entre las hormonas y proteínas, se incluyen la somatostatina y el colágeno Tipo IV. Además, metaboliza el heptapéptido angiotensina 2-8 (Ang III) hasta el hexapéptido angiotensina

3-8 (Ang IV) a través de la escisión de la arginina N-terminal, lo que sugiere que esta proteasa puede regular tanto el SRAA sistémico como los distintos SRA tisulares (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008; Ramírez et al., 2008).

La Ala-AP se expresa ampliamente en el cerebro, siendo particularmente abundante en las meninges, plexo coroideo, la glándula pineal, núcleo paraventricular y la hipófisis. Pero también se ha detectado su actividad en la corteza, núcleo caudado, putamen, núcleo subtalámico central de la sustancia gris y en el tálamo, así como en el cuerpo dorsal y ventral de la médula espinal, en el hipocampo, núcleo accumbens, sustancia negra, hipotálamo (núcleos ventromedial y dorsomedial), núcleos del rafe, el núcleo pontino, y en el capa granular del cerebelo (Luan y Xu, 2007). En el riñón, se concentra en las células epiteliales renales a lo largo de la parte apical de las membranas del borde en cepillo, células mesangiales, y los glomérulos.

La Ala-AP se ha establecido como un marcador mielomonocítico en la tipificación de la leucemia, como un receptor para el coronavirus humano 229E y el citomegalovirus humano (HCMV), como un mediador de la inflamación y la invasión de células, y como regulador de la analgesia a través del metabolismo de endorfinas y encefalinas (Söderberg et al., 1993).

Este enzima que se utiliza desde hace tiempo como un marcador biológico para detectar daños en los riñones, y su determinación en orina puede ayudar a diagnosticar ciertos trastornos renales (Quesada et al., 2012).

Glutámico Aminopeptidasa (EC 3.4.11.7)

La glutámico aminopeptidasa (Glu-AP) o aminopeptidasa A (AP A), fue descrita por primera vez por Glenner y Folk en 1962. La Glu-AP, al igual que la anterior enzima, es una proteína integral de membrana tipo II codificada en los humanos por el gen ENPEP También ha sido designada recientemente como CD249 (cluster de diferenciación 249) (Suganuma et al., 2004).

La Glu-AP es una proteína de 945 aminoácidos con un peso molecular de 107,8 kDa. Es un enzima de membrana ampliamente distribuida en el organismo, con niveles especialmente altos en el riñón. Aunque esta actividad está también presente en la circulación vascular, su origen no es del todo conocido (Cheung y Cushman, 1971). Es un enzima dependiente de zinc del tipo de las aminopeptidasas, que cataliza la

disociación del glutámico y aspártico del extremo N-terminal de distintos polipéptidos (Réaux et al., 2000).

En el SRAA, la Glu-AP presenta una gran capacidad para degradar la Ang II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro- Phe) obteniéndose des-Asp angiotensina II, también conocida como Ang III, que puede mediar algunos de los efectos del SRA en el cerebro. Este enzima elimina la acción vasoconstrictora de la Ang II transformándola en Ang III, y por lo tanto ayuda a regular la PA (Banegas et al., 2008; Ramírez et al., 2008).

Aspártico Aminopeptidasa (EC 3.4.11.21)

Es un enzima que en los humanos está codificada por el gen DNPEP. La proteína codificada por este gen es una AP que muestra preferencia por los aminoácidos ácidos, y específicamente el ácido aspártico antes que el ácido glutámico. Se cree que es una proteína citosólica implicada en el metabolismo general de las proteínas intracelulares. A esta actividad enzimática se le ha denominado durante mucho tiempo como Glu-AP, ya que se creía que se trataba de un solo enzima con actividad sobre residuos tanto aspárticos como glutámicos, pero posteriormente se ha comprobado que son dos enzimas distintos con propiedades diferentes (Ramírez et al., 2008).

La Asp-AP, además de la Glu-AP y la Ala-AP, está involucrada en las rutas metabólicas del SRA. En 1994, Sim y Qiu demostraron que la Ang I se degradaba principalmente a Ang 2-10, en lugar de Ang II, en homogenizados de hipotálamo obtenidos tanto de animales normotensos como en diferentes modelos de hipertensión. Los animales hipertensos mostraron mayores niveles de formación de Ang 2-10 que las ratas normotensas. La actividad AP que degrada Ang I en Ang 2-10 no es inhibida por amastatina, bestatina o EDTA, lo que indica que no se trata de la Glutámico o la Alanina Aminopeptidasas. Además, entre las distintas amino acil- β - naftilamidas utilizadas para su determinación (aspartil ó glutamil- β - naftilamida), la aspartil- β -naftilamida fue el sustrato más susceptible del enzima (Banegas et al., 2008).

Esta actividad enzimática se localiza principalmente en la fracción microsomal de homogeneizados de cerebro, y sufre importantes cambios durante el desarrollo. Además, la Asp-AP también muestra un ritmo circadiano con un ciclo de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad en la retina, la hipófisis, la corteza occipital y el suero, observándose un aumento de actividad al final del periodo de oscuridad en todos los

tejidos, excepto el suero donde la actividad enzimática alcanzó su punto máximo en el centro del período de luz (Ramírez et al., 1992; Arechaga et al., 1996).

En comparación con la actividad Glu-AP, la Asp-AP ha demostrado en repetidas ocasiones diferente comportamiento en el cerebro y tejidos periféricos (Banegas et al., 2006).

Los mecanismos por los cuales la acción de la Ang 2-10 en el cerebro influye en el control de la PA aún no se han dilucidado. Sin embargo, estudios en el riñón de ratas hipertensas han sugerido que el efecto de la Ang 2-10 involucra respuestas que contrarrestan la acción de Ang II. De hecho, la formación de Ang 2-10 se incrementa en el riñón de ratas hipertensas. Estos resultados podrían sugerir una respuesta compensatoria a la isquemia renal en este modelo de hipertensión. La Ang 2-10 (como la Ang IV) atenúa la acción presora de la Ang II en la vasculatura renal mesentérica vascular en las ratas Wistar-Kyoto y SHR. Los efectos de la Ang 2-10 no son inhibidos por los bloqueantes de los AT1, lo que indica que su acción es mediada por los receptores AT2. Estos hallazgos sugieren que Ang 2-10 posee acciones de protección vascular, y puede estar implicada en la fisiopatología de la hipertensión. El papel de la Ang 2-10 en el cerebro se sigue investigando (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008; Ramírez et al., 2008).

1.4.2. AMINOPEPTIDASAS Y SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Diversas APs intervienen en el metabolismo de los principales péptidos activos del SRA. En concreto, intervienen en el metabolismo de la Ang II, Ang III, Ang IV y Ang 2-10 (ver esquema 1). La Ang III se obtiene a partir del metabolismo de la Ang II por la acción de la Glu-AP que hidroliza el enlace peptídico aminoterminal con un residuo ácido, el Asp. La Ala-AP metaboliza la Ang III a Ang IV mediante hidrólisis de la Arg amino-terminal. La Ang I es transformada en Ang 2-10 por la acción de la Asp-AP tras la liberación del Asp amino-terminal (ver esquema 1) (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008).

La Ang III es un vasoconstrictor menos potente que la Ang II, estimula la secreción adrenal de aldosterona, es un estimulador neuronal y tiene la misma afinidad por los receptores AT1 y AT2. La Ang IV tiene poca afinidad por los receptores AT1 y AT2 y mucha por el receptor AT4. La Ang IV tiene un papel importante en la

regulación de flujos sanguíneos locales, incluido el cerebral, pero también se le ha asignado un papel en procesos cognitivos, estrés, ansiedad y depresión. La Ang 2-10 se opone al efecto vasoconstrictor de la Ang II. Sin embargo, también se ha dicho que este péptido daría lugar a una contracción aórtica dosis-dependiente por mediación del receptor AT1. Actualmente, en lo que se refiere al control de la PA, se trabaja con la hipótesis de una acción coordinada de los diferentes péptidos del sistema actuando conjuntamente sobre los receptores AT1, AT2 y AT4 (ver esquema 1) (Banegas et al., 2006; Banegas et al., 2008).

Está demostrado que el sistema SRAA es un importante regulador de la PA, de tal forma que una actividad mayor da lugar al desarrollo de HTA en diferentes tipos de modelos animales experimentales. La Ang II, como se ha mencionado anteriormente, se ha considerado el péptido clave para la regulación de la PA, sin embargo, actualmente se ha documentado que algunos de sus metabolitos, como la Ang III y Ang IV, juegan también un papel importante en estos mecanismos de regulación.

Se ha demostrado que la Ang III es el principal efector en la regulación de la PA y liberación de vasopresina del SRA central. Es necesario, por tanto, la conversión de la Ang II en Ang III por la Glu-AP. Posteriormente la Ang III puede ser degradada a Ang IV por la Ala-AP, aunque otras enzimas también pueden contribuir al metabolismo de las angiotensinas (Tsujimoto et al., 2008).

1.5. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO Y SISTEMAS RENINA ANGIOTENSINA LOCALES

Actualmente sabemos que el SRA tiene un componente sistémico (circulante) y otro tisular (local). Esto significa que los diferentes componentes del SRA pueden sintetizarse a nivel local, interaccionando con el sistema circulante (Timmermans et al., 1993). La Ang II tisular se produce por la existencia y acción de uno o más componentes del SRA en diferentes órganos. A largo plazo, esta producción local de Ang II ejerce efecto proliferativo y lesivo vascular a través de su interacción con factores de crecimiento, como el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Timmermans et al., 1993).

Se ha demostrado que el parénquima de muchos tejidos (vasos, corazón, cerebro y riñón) expresan todos los componentes para la generación local del péptido Ang II, de hecho, la mayor parte (entre 90 y 99%) del ECA en el organismo se ubica en los tejidos. Esta Ang II es producida dentro de los compartimientos intersticiales, cerca de sus receptores. El corazón expresa el ARNm que codifica la renina, el angiotensinógeno, el ECA y el subtipo AT1 del receptor de Ang II (Dostal et al., 1992). También tenemos evidencias de la existencia de estos componentes en los astrocitos (Raizada et al., 1993) y cardiomiocitos (Dostal et al., 1992) y muchos otros tipos celulares.

En contraste con el SRA circulante, los sistemas tisulares locales utilizan señales de tipo paracrino o autocrino (Dzau et al., 1994); esto significa que la Ang II producida *in situ* puede tener limitado su rango de actuación, porque la difusión del péptido fuera del área inmediata al sitio de producción puede estar impedida por la existencia de un entorno circundante altamente proteolítico, o porque los receptores específicos estén ausentes. También es posible que la Ang II se produzca en los tejidos a través de una vía que no depende del ECA (vía de la quinasa). Los efectos locales de la Ang II son particularmente importantes en el tejido cardiovascular, ya que este péptido es un potente vasoconstrictor que también ejerce diversos efectos sobre la estructura y la homeostasis vascular (Contreras et al., 2000). Por ejemplo, la Ang II incrementa la producción del inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno, el inhibidor endógeno primario de t-PA, y promueve el crecimiento vascular además de estimular la producción de otros factores de crecimiento (Rivera et al., 1999). La Ang II también aumenta la respuesta de agregación de las plaquetas frente a agonistas plaquetarios directos y estimula la producción de endotelinas, consideradas hoy como las más potentes de las sustancias vasoconstrictoras endógenas.

Más recientemente, han comenzado a recibir una gran atención las posibles acciones de otro componente biológicamente activo del sistema: la Ang III, que puede formarse por el efecto de la Glu-AP sobre la Ang II, o por el efecto de Asp-AP y el ECA sobre la Ang I. La Ang III y la Ang II tienen efectos cualitativamente similares.

Otro péptido biológicamente activo de este sistema que también ha despertado mucho interés es la angiotensina (1-7), un heptapéptido aminoterminal puede ser producido en diversos tejidos. En la vasculatura, su producción es consecuencia de la acción de endopeptidasas tisulares sobre la Ang I y la Ang II (Benter et al., 1993). En el

músculo liso vascular puede obtenerse a partir de Ang I y Ang II mediante metaloendopeptidasas y propil-endopeptidasas (Santos et al., 2012).

Los resultados de distintos estudios realizados en animales de experimentación, han sugerido que la angiotensina (1-7) es un vasodilatador que puede conferir efectos cardioprotectores al oponerse a las acciones de la Ang II sobre el crecimiento y la reactividad vascular. Al contrario de la Ang II, la angiotensina (1-7) no causa vasoconstricción, liberación de aldosterona, sed ni facilitación de la neurotransmisión noradrérgica. Este efecto vasodilatador parece estar mediado por la liberación de NO y bradikina endotelial (Li et al., 1997; Santos et al., 2012).

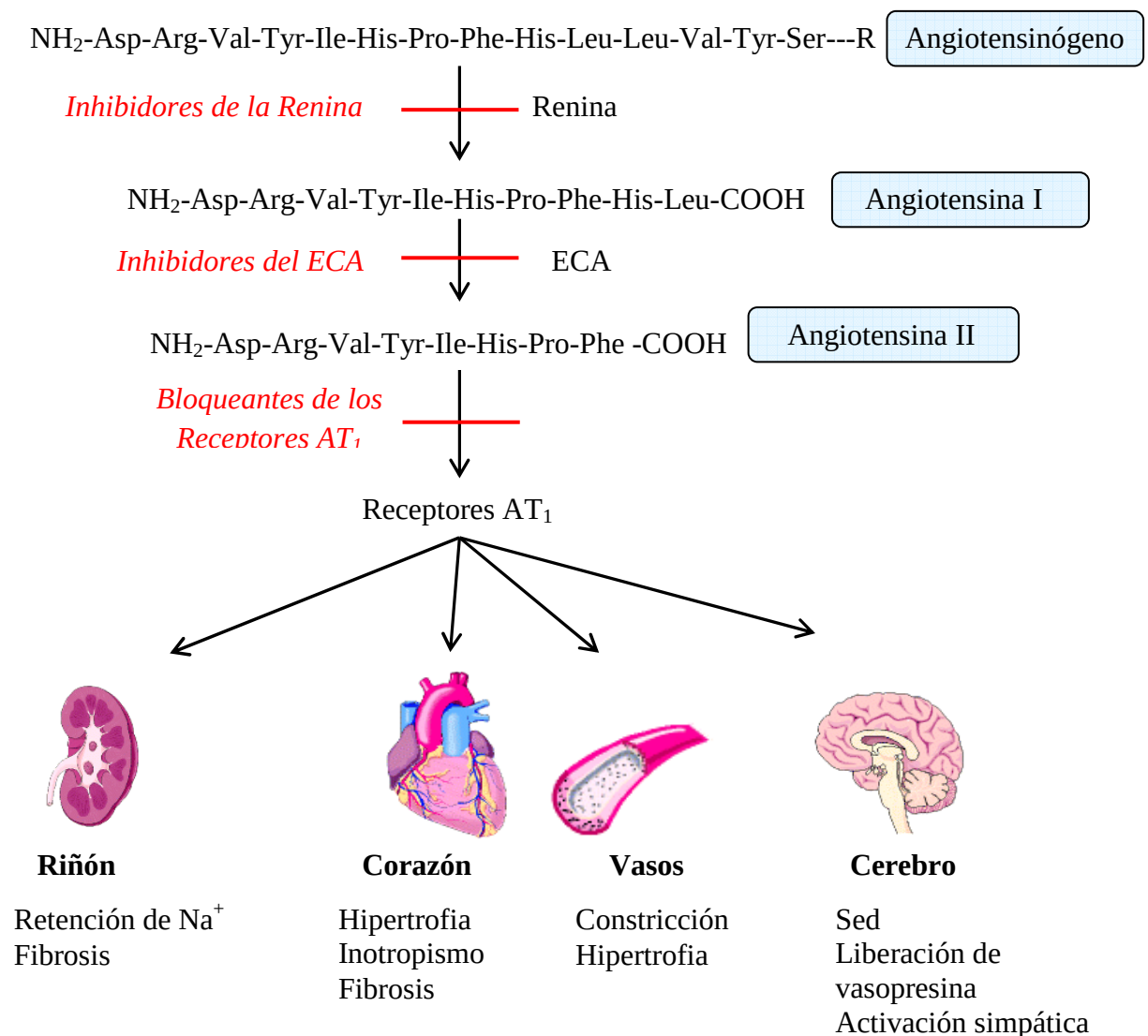


Figura 12. Representación parcial del Sistema Renina-Angiotensina (SRA). Se muestran los componentes de SRA clásico, sus interacciones, los sitios de intervención de distintos fármacos (en rojo) y los efectos principales en distintos órganos del sistema cardiovascular (Bader et al., 2008).

Los receptores subtipo AT1 de la Ang II se encuentran localizados predominantemente en el tejido vascular y miocárdico, aunque también en el cerebro, riñón y células glomerulosas de las suprarrenales, las cuales secretan aldosterona. Las principales funciones mediadas por el receptor AT1 incluyen efecto vasoconstrictor, estimulación de la síntesis y liberación de aldosterona, reabsorción tubular renal de sodio, crecimiento cardíaco, proliferación de músculo liso vascular, aumento de la actividad noradrenérgica periférica, aumento de la actividad central del sistema nervioso simpático, estimulación de la liberación de vasopresina e inhibición de la renina renal. Por su parte, los receptores subtipo AT2 se encuentran en la médula suprarrenal y posiblemente en el sistema nervioso central, y están ampliamente distribuidos en el tejido fetal (Gillies et al., 1998; De Gasparo et al., 2000).

Actualmente no se conoce en profundidad el papel que juegan en la homeostasis cardiovascular, aunque evidencias recientes sugieren que los receptores AT2 se encuentran implicados en el desarrollo y diferenciación embrionaria, estimulación de la apoptosis celular y la regeneración en varios tejidos, median el crecimiento de las células endoteliales, y se han descrito acciones antiproliferativas y vasodilatadoras. De lo anterior se desprende que los receptores AT1 y AT2 parecen mediar efectos opuestos sobre el crecimiento y la diferenciación celular, tono vascular y la liberación de la hormona arginina vasopresina. En cada uno de estos efectos, los receptores AT2 parecen modular a la baja la acción mediada por los receptores AT1, resultando en una disminución de la proliferación celular, disminución de los niveles séricos de arginina vasopresina o disminución de la respuesta vasoconstrictora. Además, en líneas de células neuronales los receptores AT2 ejercen efectos antiproliferativos y promueven el sobrecrecimiento neurítico (Chung et al., 1999). Además de las respuestas inmediatas, los receptores AT1 estimulan el crecimiento de las células vasculares y del músculo cardíaco, acción mediada por la expresión genética (Goldberg et al., 1995; De Gasparo et al., 2000).

En este trabajo nos centramos en el estudio de las AP pertenecientes al SRA que actúan a nivel renal, donde desempeñan un papel en la regulación de los péptidos renales vasoactivos y responden de manera diferente en la HTA en comparación con el estado normotenso. Por otro lado, abordaremos el estudio del SRA cerebral, donde la Ang III es un potente factor hipertensor mientras que la Ang 2-10 se sugiere que actúa disminuyendo los niveles de la hipertensión.

1.6. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CEREBRAL

El tratamiento actual de la hipertensión puede implicar diuréticos, inhibidores o antagonistas del SRA, antagonistas del calcio, o vasodilatadores. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos no es completamente satisfactoria, y los nuevos agentes involucrados en el control de la PA están siendo considerados. En los últimos años, se ha avanzado en la comprensión del papel del SRA cerebral en la patogénesis de la hipertensión.

Debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, la mayoría de los receptores para la Ang II, que se expresan en múltiples sitios en el cerebro, no puede ser alcanzados por la Ang II circulante. Para activar estos receptores, la Ang II necesita ser sintetizada a partir del angiotensinógeno, expresado localmente, por acción del ECA y la renina también locales. Las excepciones son los órganos circunventriculares (CVO), donde el endotelio fenestrado permite la acción de las hormonas presentes en la circulación, incluyendo la AngII sistémica. La activación de estos receptores conduce a un aumento de la PA, y a la aparición de la sensación de sed y el apetito por la sal. Sin embargo, actualmente contamos con evidencias que demuestran que la transducción de las señales de los CVO, y otras vías fisiológicas tales como la liberación de vasopresina o la activación del sistema nervioso simpático, requieren la presencia de un SRA local en las zonas del cerebro situadas dentro de la barrera hemato-encefálica (Morimoto et al., 2001).

A más de cuatro décadas de su descubrimiento, las funciones fisiológicas de las angiotensinas cerebrales siguen siendo en gran parte un misterio. Los primeros datos que indicaban que la Ang II tenía efectos sobre el cerebro fueron obtenidos por Bickerton y Buckley en 1961, pero hasta 1971 no se demostraría claramente la existencia de un SRA cerebral totalmente independiente del periférico (Gante et al., 1971). A partir de este momento, son muchas las investigaciones que se han dirigido al estudio de este sistema, estando probada en la actualidad su participación en el control del balance hidromineral, la presión arterial y distintas funciones neurosecretoras (Wright y Harding., 1994; Banegas et al., 2006; Speth y Karamyan., 2008).

Dentro de las funciones de control de la homeostasis corporal, cabe destacar su papel en el mantenimiento de los valores de presión arterial: la hiperactividad de este sistema subyace tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la hipertensión en distintos modelos animales, (Réaux et al., 1999), y animales transgénicos con

sobreexpresión del angiotensinógeno cerebral (Morimoto et al., 2001). Estos resultados ayudan a comprender por qué en muchos casos la hipertensión va asociada a niveles disminuidos del SRA en sangre.

Al igual que ocurre a nivel sistémico, la Ang II cerebral se genera, a partir del precursor angiotensinógeno, en la misma secuencia de reacciones que ya hemos hecho referencia con anterioridad, hasta Ang III y Ang IV. En el caso de las angiotensinas cerebrales, también era generalmente aceptada como principal forma activa la Ang II. Sin embargo, los trabajos realizados por el equipo de la Dra. Catherine Llorens-Cortes indican que sería la Ang III la principal angiotensina cerebral implicada en el control de la presión arterial (Réaux et al., 1999; Bodineau et al., 2008). Estos descubrimientos ponen de manifiesto la importancia fisiológica de las aminopeptidasas participantes en el SRA, no sólo por su papel en la degradación de la Ang II y, sino también por ser las responsables directas de la formación de distintos péptidos con actividad biológica, y lo que es más importante, determinantes en el equilibrio entre ellos, que al fin y al cabo sería la clave para el control de las funciones fisiológicas en las que participan. Por otro lado, existe una influencia del SRA sistémico sobre el cerebral, ya que la Ang II plasmática puede unirse a sus receptores en los órganos circunventriculares, activando circuitos neuronales que utilizan a la Ang II como neurotransmisor (Li y Ferguson, 1993).

En lo que respecta al control de la homeostasis energética, los receptores para las angiotensinas se expresan en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo, considerado uno de los más importantes centros de integración en el control de la homeostasis energética (Lenkei et al., 1997). Además, las neuronas del ARC proyectan a otros núcleos hipotalámicos que participan en la regulación energética, como el núcleo paraventricular (PVN) y el hipotálamo lateral (LH), donde también se expresa el receptor AT1a. En el PVN el receptor AT1a se expresa en neuronas que liberan CRH (hormona liberadora de corticotropina), cuya liberación es incrementada por la AngII, ocasionando una disminución en la ingesta de alimento y un aumento en la producción de calor (Aguilera et al., 1995). Las neuronas del PVN, a su vez, proyectan en el ARC y en distintas áreas cerebrales que modulan el tono simpático (Li et al., 2003), y los efectos de la administración central de Ang II sobre la ingesta y la producción de calor parecen estar mediados por el sistema nervioso simpático (Porter y Portratz, 2004; de Kloet et al., 2009).

Algunos de los aspectos relacionados con la intervención del SRA siguen sin ser aclarados, por ejemplo, por qué la administración periférica de I-ECAs tiene efectos similares sobre la ingesta que la administración de Ang II, tanto por vía periférica como central (Porter y Portratz, 2004; Weisinger et al., 2009). Una posible explicación a estos resultados, en principio contradictorios, sería que el efecto de estos inhibidores se ejercería exclusivamente a nivel periférico, provocando una disminución en los niveles de Ang II en plasma y un aumento en los de Ang II cerebral (Porter et al., 2003; de Kloet et al., 2009).

Aunque existen claros indicios de la participación del SRA en la regulación de balance energético y el metabolismo, los mecanismos aún no están lo suficientemente aclarados, fundamentalmente en lo que se refiere a la relación entre el SRA del SNC y el periférico, y al papel que juegan distintos componentes de este sistema, así como los posibles efectos que sobre ellos ejercen factores ambientales, como cambios en la composición de la dieta. Especial relevancia podían tener los cambios en las concentraciones de Ang IV, ya que el receptor de este péptido, el AT₄, se corresponde con la actividad IRAP, implicada en el metabolismo de otro péptido, la oxitocina, con un establecido papel anorexígeno (Olszewski et al., 2010), habiéndose descrito el papel inhibidor de la Ang IV sobre la actividad oxitocinasa (Stragier et al., 2008). A ello se suma que las dietas grasas han demostrado ser capaces de aumentar la formación de determinados mediadores lipídicos como la oleoiletanolamida (OEA) (Artmann et al., 2008) cuyo efecto sobre la ingesta parece estar mediado por un aumento de oxitocina en el hipotálamo (Gaetani et al., 2010).

1.7. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL

El SRA intra-renal fue el primer sistema tisular descrito. Los primeros estudios realizados detectaron la presencia de renina y de su ARNm fuera de las células yuxtaglomerulares, en los túbulos proximales, e incluso en los conductos colectores (Kobori et al., 2007). En estas localizaciones la renina no estaría implicada en la regulación de los niveles de Ang II circulante. Otra de las primeras evidencias sobre su existencia se obtuvo a partir de estudios in vivo donde se administró localmente un bloqueante del receptor AT₁. Este tratamiento produjo un aumento del flujo plasmático renal y de la tasa de filtración, así como un incremento de la excreción de agua y sodio, resultado que indicaba un papel local para la AngII en el riñón. A partir de ese momento

fueron muchos los estudios encaminados a localizar la expresión de los distintos componentes del SRA en el riñón (Carey y Siragy, 2003). A partir de sus resultados, se concluyó que la mayor parte del angiotensinógeno y la renina se expresaban en los túbulos contorneados proximales (Robrwasser et al., 1999). Una interesante observación que constató la importancia del SRA intra-renal, es que la concentración de AngII es hasta mil veces superior en el fluido intersticial del riñón que en el plasma (Nishiyama et al., 2002). El SRA intra-renal pueden ser de gran importancia para la regulación de la PA, como un amplificador de las acciones circulantes de la Ang II (Bader y Ganten, 2008).

También conocemos la interrelación entre el SRA sistémico y el intra-renal: La AngII plasmática es capaz de estimular la síntesis del angiotensinógeno en el riñón (Ingelfinger et al., 1999, Kobori et al., 2007). Los receptores para la AngII se encuentran distribuidos en prácticamente todas las localizaciones dentro de nefrona (células mesagiales glomerulares, membranas basal y apical de las células del túbulo proximal, epitelio de la rama ascendente del asa de Henle, túbulo distal y colector, mácula densa y células musculares lisas de las arteriolas aferentes y eferentes), lo que permite suponer que el SRA intra-renal participa en el control de todas las funciones de la nefrona (Carey y Siragy, 2003).

Entre las distintas funciones mediadas por la AngII están, a nivel glomerular, la contracción de las arteriolas aferentes y eferentes y de las células mesangiales, lo que ocasiona una disminución del flujo renal y de la tasa de filtración. En los túbulos proximales incrementa la reabsorción de sodio por un aumento de los transportadores Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{CO}_3\text{H}^-$ y de la Na^+/K^+ ATPasa. En la zona distal del túbulo de la nefrona la AngII también modifica la actividad del transportador Na^+/H^+ y de los canales epiteliales para electrolito (Carey y Siragy, 2003). Por último, la reabsorción de sodio en el asa de Henle también se incrementa por la disminución del flujo sanguíneo medular. Todas estas acciones se llevan a cabo a través del receptor AT1, y su efecto global es el de disminuir la excreción de sodio.

El receptor AT2 también se ha descrito en distintas localizaciones renales (células epiteliales de glomérulo y de los túbulos corticales y células intersticiales). A diferencia del AT1, la estimulación del AT2 aumenta la natriuresis, bien directamente o a través del NO-GMPc (Haithcock, 1999; Jin, 2001).

El SRA local del riñón puede ser crucial para el daño renal causado por la hipertensión. Se ha demostrado recientemente que los ratones que carecen de angiotensinógeno intra-renal, desarrollan un menor daño en el riñón hipertenso que los ratones control. En consecuencia, en los ratones que generan más Ang II intrarenal, el desarrollo de la HTA y las lesiones renales se amplía. Muller et al., en 2002, investigaron sobre los mecanismos implicados en el daño renal producido por la Ang II, y encontraron que este péptido induce una respuesta inflamatoria e inmunológica, lo que conduce a la fibrosis intersticial, glomeruloesclerosis, albuminuria y finalmente, la insuficiencia renal (Bader y Ganten., 2008).

Por otro lado, al igual que ocurre a nivel sistémico o en el cerebro, la AngII no es el único péptido activo de este sistema tisular. Otros péptidos, como la AngIII, AngIV y Ang1-7, también han sido descritos en el riñón, donde afectan a distintas funciones renales, en la mayoría de los casos de forma contraria a la AngII (Simões-e-Silva et al, 1997; Santos et al, 2000; Caruso-Neves et al., 2000; Varagic et al, 2008).

1.8. FÁRMACOS REGULADORES DE LA PRESIÓN ARTERIAL: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL

La HTA es un trastorno frecuente que, si no se trata eficazmente, aumenta en gran medida la probabilidad de trombosis coronaria, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal. Hasta alrededor de 1950 no existió ningún tratamiento eficaz, y el desarrollo de los antihipertensivos, que normalizan la esperanza de vida sana, constituyeron un hito terapéutico importante (Rang et al., 2004).

Los IECA y los β -bloqueantes son agentes utilizados para bloquear los efectos del SRAA. Si bien han sido utilizados eficazmente en el tratamiento de la hipertensión y la enfermedad renal, sus efectos en la reducción de la morbilidad y la mortalidad asociada con la insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio han generado una amplia investigación sobre los beneficios de estos agentes, más allá de la reducción de la presión arterial (Ramadan et al., 2007).

Numerosos estudios han sido realizados para definir los factores reguladores que participan en la patogénesis de la hipertensión en ratas SHR. Estos estudios han demostrado que a pesar de la presencia de la actividad en plasma normal de la renina, la Ang II parece jugar un papel clave en la patogénesis del aumento de la PA en este

modelo. La PA se normaliza tras la administración de inhibidores de la renina, o del ECA, antagonistas del receptor de angiotensina II y β -bloqueantes. Sin embargo, a pesar de la eficacia de estos agentes en el control de la PA, los mecanismos implicados no están totalmente aclarados.

1.8.1. INHIBIDORES DEL ENZIMA CONVERTIDOR DE ANGIOTENSINA (IECA).

El Captopril es un medicamento oral y un miembro de una clase de fármacos denominados Inhibidores del Enzima Convertidor de Angiotensina (IECA). Los IECA se utilizan para tratar la PA alta y la insuficiencia cardíaca, así como para prevenir la insuficiencia renal debido a la hipertensión y la diabetes.

El desarrollo de Captopril fue uno de los primeros ejemplos exitosos de diseño de fármacos a partir del conocimiento químico de la molécula sobre la que actúa el enzima. Se había observado que varios péptidos pequeños son inhibidores débiles de este enzima, pero no son adecuados para usarlos como fármacos debido a su baja potencia y su escasa absorción oral. Captopril se diseñó para conseguir las propiedades estéricas de estos antagonistas en una molécula no peptídica. Contiene un grupo sulfidrilo situado para unirse al átomo de cinc, acoplado a un residuo de prolina que ocupa la zona del enzima a la que normalmente se acomoda la leucina terminal de la Ang I (Rang et al., 2004).

El Captopril (ver figura 9) mimetiza la forma de los dos últimos restos peptídicos de la Ang I, lo que permite su unión con los centros de anclaje de la molécula original y éste queda bloqueado en el centro activo del enzima, al sustituir el enlace peptídico diana (enlace N-C) por un enlace C-C que requiere una energía de activación más elevada. Esta unión es irreversible (Rang et al., 2004).

Los inhibidores del ECA son medicamentos que disminuyen (inhiben) la actividad de este enzima al tiempo que disminuyen la producción de Ang II. Como resultado, los vasos sanguíneos se dilatan y la PA se reduce. La menor PA hace que sea más fácil para el corazón bombear la sangre, lo que mejora su función en la insuficiencia cardíaca. Además, la progresión del daño renal causada por la PA alta o la diabetes se hace más lenta. La U.S. Food and Drug Administration (FDA) aprobó el Captopril en abril de 1981. Este fármaco es altamente selectivo y, no interactúan directamente con otros componentes del SRA (Breckenridge, 1988).

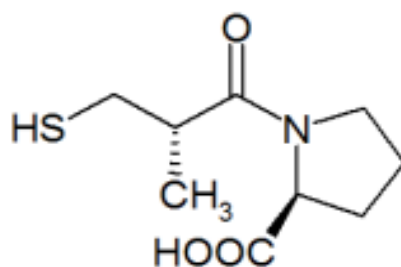


Figura 9. Estructura química del Captopril

El Captopril es un potente inhibidor de las acciones de la Ang II en todo el organismo. Sólo ocasiona una pequeña disminución de la presión arterial en animales normales, pero en animales hipertensos provoca una reducción mucho mayor, sobre todo en quienes está estimulada la secreción de renina. Los IECA actúan sobre los vasos de capacidad y de resistencia y reducen la carga cardíaca, por lo que el GC normalmente aumenta. Actúan preferentemente sobre los lechos vasculares sensibles a angiotensina, entre los que figuran los del riñón, corazón y cerebro. Esta selectividad puede ser importante para mantener una perfusión adecuada de estos órganos vitales en situaciones de disminución de la presión de perfusión (Rang et al., 2004).

Los IECA también pueden tener efectos beneficiosos adicionales. Estos incluyen la regresión de la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) y la remodelación del lecho vascular. En un meta-análisis de ensayos que investigaban los agentes que revierten la HVI, los IECA han demostrado ser superior a otras clases de antihipertensivos (Cheung, 2002).

Finalmente, Los IECA también inhiben la degradación de otras sustancias incluyendo las bradicininas (péptidos vasodilatadores y antiproliferativos), sustancia P y encefalinas.

1.8.2. BETA-BLOQUEANTES

El Propranolol es el nombre de un fármaco β -bloqueante utilizado principalmente en el tratamiento de la hipertensión. Fue el primer β -bloqueante efectivo producido y el único principio activo con eficacia demostrada. El Propranolol también

puede utilizarse para atenuar manifestaciones físicas de la ansiedad tales como los temblores o el miedo escénico (Rang et al., 2004).

El Propranolol (ver figura 10) es un β -bloqueante no selectivo, es decir, bloquea la acción de la epinefrina tanto en receptores adrenérgicos β_1 como en receptores adrenérgicos β_2 . Tiene poca actividad simpaticomimética intrínseca, aunque tiene una fuerte actividad estabilizadora de membranas a altas dosis. El efecto antagonista de receptores adrenérgicos es exclusivo del L-Propranolol, no del D-Propranolol, pero ambos tienen efectos anestésicos locales (Rang et al., 2004).

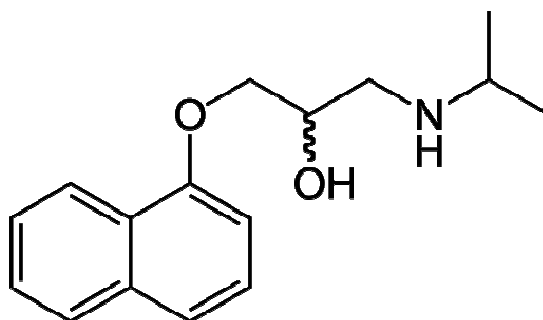


Figura 10. Estructura química del Propranolol

La acción antihipertensiva del Propranolol se debe al bloqueo de los receptores β presinápticos, disminuyendo la actividad simpática a nivel cardiaco, renal, arterial y nervioso, produciendo efectos tales como la disminución de la secreción de renina y consecuentemente Ang II (Cutler y Davis, 2008)

El Propranolol, disminuye el GC y presentan una serie de mecanismos secundarios, como la disminución de la secreción de renina y la inhibición del SRAA, además de tener acción sobre el SNC, aunque mal conocida, y actuar sobre los barorreceptores, permitiendo que el organismo soporte presiones más bajas (Priviero et al., 2007).

Los estudios clínicos han demostrado que la disminución de la PA por los bloqueantes β -adrenérgicos se debe fundamentalmente a una reducción de la resistencia vascular periférica, que puede ser una consecuencia de numerosos mecanismos, incluyendo la relajación derivada de la secreción de factores endoteliales, la disminución de la producción del anión superóxido y/o a propiedades antioxidantes (Cutler y Davis, 2008). Sin embargo, los mecanismos exactos por los que el Propranolol

a largo plazo reduce la PA en hipertensos son todavía desconocidos y poco investigados. Estudios experimentales realizados en ratas han demostrado que el Propranolol reduce la HTA, la hipertrofia de los cardiomiocitos y la fibrosis miocárdica inducida (Priviero et al., 2007).

1.9. PRESIÓN ARTERIAL Y ÓXIDO NÍTRICO

El endotelio vascular es un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo. Es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. Lejos de ser sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos, es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre, y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, algunas de las cuales tienen funciones antagónicas, como vasodilatadores y vasoconstrictores o hemostáticos y antihemostáticos (Martínez et al., 2004).

Durante mucho tiempo se pensó que la única función del endotelio vascular era de naturaleza pasiva y que consistía en separar la sangre de las estructuras adyacentes. En la actualidad se conocen ya muchas funciones del endotelio vascular que incluyen entre otras la regulación de la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea, la modulación del tono vascular, la regulación de la proliferación de las células del músculo liso y la capacidad de reclutar células sanguíneas. Lógicamente, por tanto, las alteraciones de la fisiología endotelial (disfunción endotelial) están implicadas en numerosas situaciones patológicas entre las que destaca la aterosclerosis e HTA. En los últimos años ha quedado bien establecido que la disfunción endotelial constituye una de las primeras etapas en el desarrollo de la aterogénesis y contribuye también a la progresión de la placa aterosclerótica y a la aparición de las complicaciones clínicas correspondientes. En estas condiciones, el endotelio pierde sus características antiagregantes, anticoagulantes y fibrinolíticas, pasando a favorecer la formación de trombos y coágulos. Y pasa de tener efectos vasodilatadores a originar vasoconstricción. Por otra parte, se favorece la adhesión de células inflamatorias y la proliferación de las células de músculo liso (Martínez et al., 2004).

Las causas de la disfunción endotelial son muy numerosas (infecciones, agentes oxidantes, hipercolesterolemia, turbulencias sanguíneas, etc.). Las células endoteliales pueden responder a estas agresiones de manera muy rápida en ocasiones, pero la respuesta endotelial suele ser a largo plazo mediante la modulación de la expresión génica de proteínas diversas involucradas en la adaptación funcional. Así, por ejemplo, como resultado de la agresión al endotelio, disminuye la producción del óxido nítrico, de carácter vasodilatador, y se induce la síntesis de las endotelinas, proteínas de acción vasoconstrictora (Martínez et al., 2004).

El NO como compuesto químico fue descrito en el siglo XVIII. Las propiedades químicas y biológicas del NO lo convierten en un poderoso mediador paracrino y autocrino con gran capacidad para actuar como modulador local de la PA, del flujo sanguíneo, de la hemostasis y de múltiples acciones de gran importancia fisiológica en la HTA (Pastellín et al., 2007).

Furchgott y Zawadski descubrieron en 1980 el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, al describir el fenómeno de la relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Ellos demostraron que anillos arteriales previamente contraídos se podían relajar en respuesta a la acetilcolina sólo si las células endoteliales estaban intactas. Eliminando el endotelio anulaban la vasorelajación producida por acetilcolina, lo cual sugería que estaba mediada por alguna sustancia derivada de endotelio que se denominó EDRF (factor relajante derivado del endotelio). Posteriormente se demostró que el EDRF era el NO. El NO difunde al músculo liso vecino, activa la enzima guanilato-ciclasa soluble, por lo cual aumentan los niveles celulares del segundo mensajero GMPc, que a su vez relaja a la célula muscular por disminuir el calcio citosólico necesario para la interacción de las proteínas contráctiles. La mayoría de los estímulos vasodilatadores, como el flujo sanguíneo y numerosos agonistas de receptores de membrana acoplados a proteína G, relajan indirectamente al músculo liso vascular a través de la liberación endotelial de NO. Es importante destacar que muchos de estos agonistas actuando directamente sobre receptores de la célula muscular lisa, de las plaquetas, o sobre proteínas sanguíneas producen vasoconstricción, agregación plaquetaria y/o coagulación. De manera que la respuesta simultánea de un endotelio sano amortigua las consecuencias vasculares de cualquiera de estos efectos (Ferrer et al., 1998).

1.9.1. SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

El NO es producido a partir del aminoácido básico L-arginina por tres diferentes isoformas de la NO-sintetasa: NOS neuronal (NOSn), NOS inducible (NOSi) y NOS endotelial (NOSe), expresadas en prácticamente todos los tipos de células vasculares. Pero es la isoforma endotelial la principal responsable de la síntesis de NO en las células endoteliales. Mientras que NOSe y NOSn son proteínas constitutivamente expresadas, la expresión de NOSi requiere la interacción de la célula con estímulos que generen señales nucleares apropiadas. Las tres isoformas de NOS comparten un ciclo catalítico similar, que consiste en la oxidación de L-arginina para formar NO y L-citrulina, en una compleja reacción que utiliza como co-sustratos O_2 y nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH), y requiere varios cofactores redox como tetrahidrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina adenina mononucleótido (FMN) y el grupo Hemo (ver figura 11) (Vázquez et al., 1998; de Gasparo, 2002).

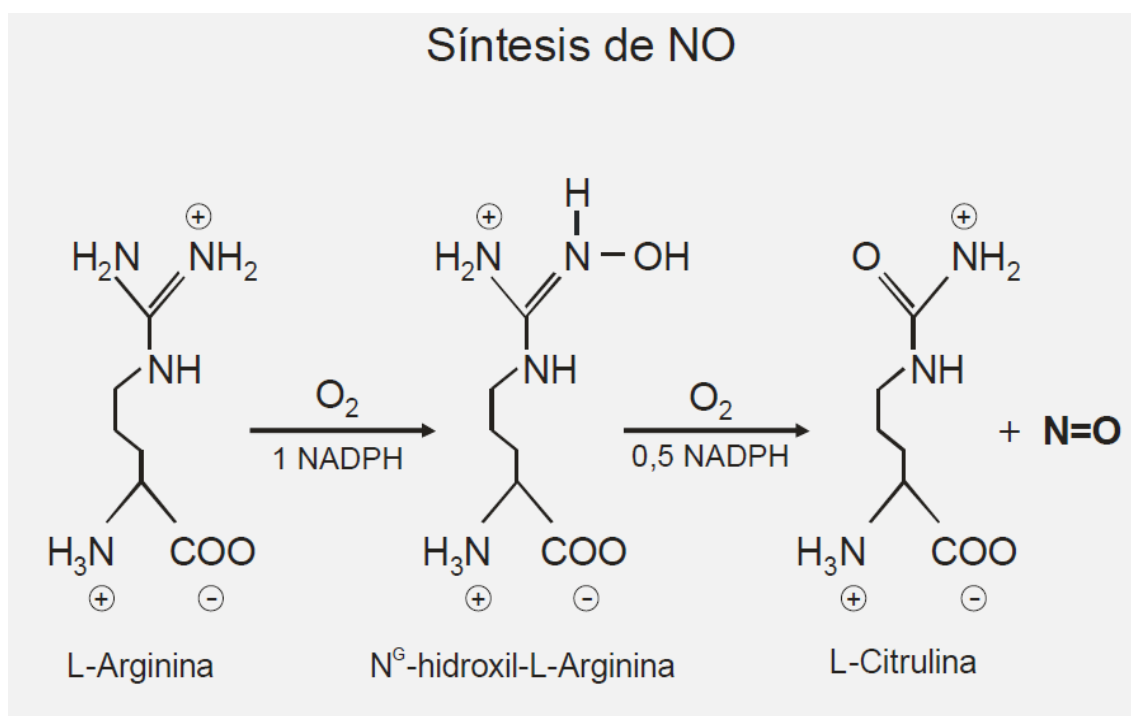


Figura 11. Síntesis del Óxido Nítrico (Vázquez et al., 1998).

El monómero de la NOS consiste en un dominio oxigenasa N-terminal, asociado al grupo Hemo y un dominio reductasa C-terminal, asociado a las flavinas, unidos por una región regulatoria que contiene el lugar de interacción con calmodulina. La

dimerización de la NOS es esencial para su actividad, porque permite que ocurra la transferencia de electrones desde el dominio reductasa de un monómero al dominio oxigenasa del otro. La dimerización ocurre por interacción de los dominios oxigenasa a través del cofactor BH₄. Tanto L-arginina como BH₄ promueven la formación del dímero y lo estabilizan, por lo tanto bajas concentraciones de alguno de ellos desacoplan el enzima y en esas condiciones se produce el radical superóxido (O²⁻) (Panda et al., 2002). La síntesis de NO depende de la unión de la NOS a la proteína calmodulina. Para unir calmodulina y en consecuencia activarse, NOSe y NOSn requieren aumentos del Ca⁺² intracelular. En contraste NOSi, que tiene una afinidad alta por la calmodulina, puede unirse a esta proteína a concentraciones muy bajas de Ca²⁺. Así, la actividad de NOSe y NOSn está críticamente regulada por los cambios transitorios del Ca²⁺ intracelular en respuesta a estímulos diversos, mientras que la actividad de las NOSi es independiente de Ca²⁺ y puede mantenerse tónicamente activa durante varios días (Ferrer et al., 1998; Panda et al., 2002).

Uno de los mecanismos fisiológicos más importantes de regulación de la producción y liberación del NO es la fuerza de roce que ejerce el flujo sanguíneo laminar al circular por los vasos (shear stress) (Weber et al., 2005). Con el ejercicio, el aumento del volumen minuto se traduce en un incremento de la perfusión tisular regional debido a la mayor actividad de NOSe inducida por el aumento de la fuerza de roce. Se produce una respuesta inmediata de liberación de NO mediada por el aumento del Ca²⁺ intracelular y la fosforilación de la enzima. La fuerza de roce puede además, sostener en el tiempo la mayor producción de NO dado que genera cambios nucleares (regulación del promotor) que se manifiestan en el aumento del número de copias de ARNm para las NOSe y además aumenta la estabilidad el ARNm (Ferrer et al., 1998; Weber et al., 2005).

1.9.2. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La HTA es un importante FR para la enfermedad arterial coronaria. Una característica de la HTA, que parece ser crítica en el desarrollo de enfermedad vascular, es la alteración de la función endotelial. Se produce una marcada reducción vasodilatación dependiente del endotelio en las arterias coronarias grandes y pequeñas de los seres humanos hipertensos y modelos animales de hypertension (Zhang et al., 2004). Los datos obtenidos sugieren que este deterioro vascular puede estar relacionado

con una disminución de la producción y la biodisponibilidad del NO, que puede ser el resultado de un aumento de la producción del O^{2-} o de una disminución de los niveles endoteliales de BH_4 o l-arginina. Curiosamente, la administración del precursor del NO, la L-arginina, restaura el endotelio mediante una acción vasodilatadora en pacientes con hipertensión esencial, mejorando la hemodinámica coronaria en ratas espontáneamente hipertensas, y aumentando la producción de NO y reduciendo la PA en ratas hipertensas con o sin insuficiencia renal (Zhang et al., 2004).

La alteración de la función endotelial, que se manifiesta por el desorden del control del tono vasomotor, está presente en diversas enfermedades cardiovasculares como HTA, tanto en grandes arterias y venas como en la microvasculatura. Además, muchos de los FR asociados con la ECV como tabaquismo, hipercolesterolemia, diabetes mellitus, hipoestrogenismo, hiperhomocisteinemia, también están asociados con la disfunción endotelial (Schächinger et al., 2000). Estas asociaciones sugieren que podrían existir mecanismos comunes a través de los cuales la función endotelial se perturba. El grado de deterioro de la función endotelial se considera un predictor de futuros accidentes cardiovasculares (Perticone et al., 2001). Esta observación indica que la disfunción endotelial no sólo es un marcador de enfermedad vascular sino que además contribuye a la progresión de la misma. Se ha demostrado que intervenciones terapéuticas que disminuyen el número de accidentes cardiovasculares también mejoran la función vasomotora endotelial. Más aún, el grado de mejoría del tono vasomotor en respuesta a intervenciones terapéuticas, aparece como una medida potencial de la eficiencia del tratamiento (Török, 2008).

En la HTA, el endotelio vascular está deteriorado y promueve cambios funcionales de la pared vascular. Los pacientes hipertensos tienen deprimida la relajación dependiente de endotelio y este trastorno está asociado a una menor bioactividad del NO. Panza y colaboradores, en 1995 demostraron que el aumento de flujo sanguíneo en el antebrazo en respuesta a distintos agonistas que estimulan la producción de NO (como acetilcolina, sustancia P y bradicinina) es significativamente menor en pacientes hipertensos que en normotensos. Esta diferencia desaparece cuando ambos grupos son previamente tratados con N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor de la NOS y además, los hipertensos presentan una respuesta vasodilatadora conservada al nitroprusiato de sodio, dador de NO que actúa directamente sobre el músculo liso vascular. Estos resultados confirman que en la HTA

la disfunción endotelial efectivamente está asociada a una menor biodisponibilidad de NO (Panza et al., 1995). Más aún, Plavnik y colaboradores, en 2007 obtuvieron resultados similares en una población sana, sin factores de riesgo, con PA sistólica normal-alta (Plavnik et al., 2007). Estas observaciones indican que la disfunción endotelial representa un cambio temprano en aquellos sujetos que desarrollarán HTA en el futuro, y que por lo tanto puede ser el disparador del desarrollo de la HTA, hallazgo que permite acentuar la atención en esta población y prevenir complicaciones futuras. Si la disfunción endotelial es promotora de hipertensión, esto podría explicar la asociación entre hipertensión y otras patologías que alteran la función endotelial como diabetes, obesidad o hipercolesterolemia (Landmesser y Drexler, 2007).

1.9.3. EL ÓXIDO NÍTRICO Y EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.

Desde su descubrimiento como un importante vasodilatador endógeno, ha llegado a ser evidente la existencia de un sutil equilibrio entre el efecto vasoconstrictor de la Ang II y el vasodilatador del NO. Ambos factores se influyen mutuamente en su producción y funcionamiento. A corto plazo, la Ang II estimula la liberación de NO modulando de esta forma la acción vasoconstrictora del péptido, y a largo plazo estimula la expresión de la NOS. Mientras el NO disminuye la expresión del receptor AT1, contribuyendo de esta forma a la acción protectora del NO sobre el lecho vascular (Millat et al., 1999; De Gasparo, 2002).

Si el endotelio es la fuente de Ang II, también es responsable de la síntesis de NO, un potente vasodilatador, que puede ser inactivado por los aniones superóxido. Tanto la Ang II como el NO pueden ser protectores o perjudiciales para órganos diana tales como el endotelio, las células musculares lisas vasculares y las células mesangiales, afectando tanto al tono vascular como a su remodelación, y a el volumen de líquido. Por lo tanto, un desequilibrio entre la Ang II, el NO endotelial y las especies reactivas de oxígeno (ROS) constituye un factor clave para las enfermedades cardiovasculares y el daño renal (De Gasparo, 2002).

La disfunción endotelial está claramente vinculada a un aumento de estrés oxidativo. Estas alteraciones funcionales conllevan cambios estructurales y secuelas como infarto de miocardio, isquemia, insuficiencia cardíaca, apoplejía y la muerte. Por

lo tanto, el exceso de superóxido vascular reduce la biodisponibilidad de NO y promueve aún más el estrés oxidativo vascular (De Gasparo, 2002).

El endotelio también posee su propio ECA, capaz de formar AngII que se une a los subtipos de receptores AT1 y AT2. El AT1 predomina en músculo liso y el AT2 se expresa también en células endoteliales. Cada uno de estos receptores tiene propiedades y efectos prácticamente antagónicos. El ECA no solamente convierte Ang I en Ang II, sino que también inactiva a la bradiquinina (o quinasa II), la cual promueve la liberación de NO, PGI₂ y el factor hiperpolarizante endotelial (EDHF). Es así como la inhibición con fármacos del ECA, además de bloquear la acción directa de Ang II, potencia la bradiquinina (y todo su efecto benéfico), contrarrestando la vasoconstricción y restaurando en parte, la disfunción endotelial (De Gasparo, 2002).

1.9.4. EL ÓXIDO NÍTRICO EN LA HIPERTENSIÓN ESPONTÁNEA

El papel del NO en ratas SHR sigue siendo un tema de debate. El deterioro o el incremento de la función del NO han sido descritos en ratas SHR (Török, 2008).

La función endotelial de los vasos en el modelo SHR ha sido motivo de controversia incluso antes de que se conociera la existencia del factor de relajación derivado del endotelio (EDRF). Ya en 1966 Spector y colaboradores, demostraron que los vasos de las ratas SHR se relajan mejor que los de ratas normotensas, pero posteriormente se describió lo contrario. Tras el descubrimiento del EDRF, la respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente de los vasos de SHR ha demostrado ser defectuosa. Se ha sugerido que este deterioro sería debido a una capacidad disminuida del músculo liso vascular para contrarrestar una producción excesiva de factores contráctiles (Spector et al., 1996; Nava, 1998; Török, 2008).

Respecto a la biología del NO en la hipertensión genética, existen estudios que apuntan a que la actividad y/o expresión de la NOS estaría aumentada en las arteriolas, corazón, y riñón (Nava, 1998). Además, la concentración del producto de oxidación del NO, el nitrato, es más alta en ratas SHR que en los controles normotensos. Sin embargo, la acumulación de GMP cíclico en vasos de resistencia es similar en ratas normotensas e hipertensas. Por último, el tono vasodilatador dependiente de NO, (evaluado por los efectos hipertensores de la administración de inhibidores de la NOS) también es similar en hiper- y normotensión (Nava, 1998). Por consiguiente, el NO producido

endógenamente estaría aumentado en el modelo SHR, pero sus efectos biológicos están disminuidos posiblemente por un exceso de radicales libres.

El corazón es un órgano diana importante en la hipertensión. La expresión y actividad enzimática de NOSe es más alta en endotelio de corazones de SHR adultas (Nava et al., 1998). Las ratas SHR muy jóvenes, que no han tenido tiempo de desarrollar hipertensión, no presentan este aumento de actividad. Por otro lado, la actividad aumentada de NOSc ocurre a expensas del ventrículo izquierdo que es el que ha de soportar la PA aumentada en la rata SHR. Estas observaciones sugieren, una vez más, que es la PA elevada la que condiciona el incremento de la actividad NOS (Nava et al., 1998).

Se ha demostrado que el tratamiento de las ratas SHR con indapamida aumentó la actividad de la NOS en la aorta y mejoró la relajación inducida por acetilcolina de la arteria femoral (Kojšová et al. 2006).

Estudios realizados muestran que la actividad de la NOS constitutiva Ca^{2+} dependiente en la médula renal es más alta en ratas SHR que en ratas normotensas. Se ha observado que la actividad aumentada de la NOS en la médula de las SHR ocurre fundamentalmente a expensas de la isoforma neuronal y menos de la isoforma endotelial, y los riñones de ratas SHR presentan una llamativa inmunotinción para NOSn en los túbulos colectores medulares y en las fibras nerviosas (Nava et al., 1998). En los riñones de ratas normotensas esta tinción es menos intensa. Las diferencias en la inmunotinción para NOSe entre ratas normo e hipertensas son menos patentes. Resulta interesante que, mientras que en el sistema cardiovascular la hipertensión conduce a un aumento de la isoforma endotelial, en el riñón aumenta fundamentalmente el enzima neuronal. Dado que el control de la PA mediado por NO parece ser de origen NOSn, es posible que el riñón se intente adaptar a la HTA sobreexpresando NOSn, y el sistema cardiovascular por medio de NOSe (Nava, 1998).

1.9.5. INHIBIDORES DEL ÓXIDO NÍTRICO

Se han identificado inhibidores de la síntesis de NO entre los que destacamos el L-NAME (ver figura 12). Este compuesto es un análogo de la L- Arginina, de manera que su administración va a producir un aumento de la PA, quizás debido a la mayor acción de los sistemas vasoconstrictores como consecuencia de la disminución de la

síntesis del NO (Lahera et al., 1997). En estudios realizados con un modelo animal de hipertensión inducido por L-Name, la administración concomitante de propranolol lograba atenuar dicho efecto mediante un aumento de la acción relajante de la acetilcolina en las arterias (Priviero et al., 2007).

La administración crónica de inhibidores de la NOS, como el L-NAME produce HTA sostenida en ratas, que puede estar acompañado por cambios histopatológicos en el tejido cardíaco y renal. Se ha demostrado también una estrecha relación entre la hipertensión provocada por la inhibición de la síntesis de NO y el SRA, ya que el aumento en los valores de PA debidos a la administración de L-NAME en ratas SHR, pueden ser contrarestrados por el tratamiento con un IECA, lo que demostraría que el efecto del L-NAME en este modelo animal podría deberse, al menos en parte, a una estimulación del SRA, así como las alteraciones renales y cardíacas asociadas (Zhou y Frohlich, 2007; Simonet et al., 2012).

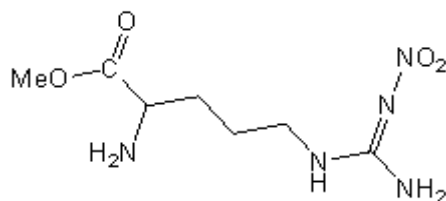


Figura 12. Estructura química del L-NAME.

La administración in vivo de inhibidores de NO sintasa como el L-NAME, como hemos mencionado anteriormente, produce la elevación de la PA y un aumento de la resistencia vascular periférica que se asocia con cambios estructurales y funcionales. La inhibición crónica de la NOS en ratas adultas produce disfunción endotelial, incremento de la respuesta vascular a los estímulos adrenérgicos y la inflamación perivascular (Hsieh et al., 2004), cambios en elementos del SRA (Takemoto et al., 1997), y en diversos factores derivados del endotelio (Paulis et al., 2008).

La modulación farmacológica de los sistemas antes mencionados, manifiesta su importante papel en el desarrollo o mantenimiento de la HTA inducida por L-NAME. Sin embargo, la deficiencia en la formación de NO parece ser el principal factor responsable del desarrollo de la HTA inducida por L-NAME. Tal idea está también

apoyada por el hecho de que este tipo de hipertensión se puede prevenir mediante la administración de donantes de NO (sustancias que contienen NO en su estructura). Por ejemplo, desde hace muchas décadas, los nitro-vasodilatadores se han utilizado para el tratamiento de la angina de pecho, debido a su capacidad de generar NO (Paulis et al., 2008).

Bernátová et al., en 2007 demostraron que la administración crónica de bajas dosis de L-NAME da lugar a una elevación transitoria de la PA. Esto se asoció con una elevación de la actividad NOS en la aorta y el ventrículo izquierdo, y se acompañó por la relajación dependiente del endotelio y la vasoconstricción reducida de la arteria femoral. Estos hallazgos sugieren que la administración crónica de bajas dosis de L-NAME se podría utilizar para aumentar la producción NO, en vez de con la suplementación con donantes exógenos de NO, que pueden inhibir la síntesis del NO endógeno. La prolongación de la administración de L-NAME de 4 a 8 semanas aumentó aún más la PA, pero no consiguió mejorar el deterioro de la relajación dependiente del endotelio (Török et al., 1998).

1.10. ACEITE DE OLIVA

El Aceite de Oliva, se produce a partir del fruto de la oliva, la cual se cultiva ampliamente en la cuenca del Mediterráneo donde se localiza más del 95% de la producción de aceite de oliva del mundo. El 75% de la producción mundial proviene de la Unión Europea (principalmente España, Italia y Grecia) y el resto de los países de Asia Menor (Perona et al., 2006).

Entre los aceites y las grasas más consumidos por el ser humano destacan: el aceite de palma (es el más utilizado), seguido por los de soja, colza-canola y girasol (ver tabla 5). Todos estos aceites se obtienen por extracción química de las correspondientes semillas y, con excepción de la vitamina E que se solubiliza en el procedimiento de extracción, los triglicéridos van a ser los determinantes de sus propiedades biológicas. (Fuente: <http://www.fas.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html>; 2004).

Aceites	Consumo 2009 (x106 toneladas)
Palma	43,2
Soja	37,3
Colza	19,8
Girasol	11,7
Palmiste	5,1
Cacahuete	5,0
Algodón	4,7
Coco	3,6
Oliva	3,0

Tabla 5. Consumo de los aceites más utilizados en el mundo.

Fuente: <http://www.fas.gov/bbs/topics/news/2004/NEW01129.html>; 2004

El aceite de oliva no es un aceite muy consumido en el mundo, pero ha sido la principal fuente de grasa en la alimentación clásica de la cuenca mediterránea, conocida como la dieta mediterránea. Podemos encontrar cuatro categorías de aceite aptas para el consumo: aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva y aceite de orujo de oliva, siendo el aceite de oliva virgen extra el que conserva la mayor cantidad de la fracción insaponificable, y el que posee la mayor cantidad de antioxidantes. Por ello, el aceite de oliva virgen extra es el que ejerce los mayores efectos beneficiosos para la salud ([http:// www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org).2006).

Las referencias al olivo se remontan a los tiempos bíblicos, a la época romana y a la griega mitológica. Históricamente, los productos del olivo han sido utilizados no sólo como alimentos, sino también como afrodisíacos, emolientes, laxantes, sedantes y tónicos. También han sido empleados tradicionalmente para el tratamiento de patologías específicas como los cólicos, alopecia, parálisis, enfermedades reumáticas (dolores articulares, ciática...) e hipertensión arterial (Waterman et al., 2007).

El aceite de oliva es la principal fuente de grasa añadida en la alimentación de los países donde se cultiva el olivo, y como ya hemos indicado, forma parte de la comúnmente conocida como "Dieta Mediterránea", destacando en el uso de este alimento aquellos países que rodean el Mar Mediterráneo. Se ha visto que estos países tienden a tener una baja incidencia de enfermedades crónicas degenerativas y aunque existen diferencias entre la dieta de unas regiones y otras, una característica en común para todos los países de la cuenca Mediterránea es el alto consumo de aceite de oliva, ya sea crudo o como principal grasa para cocinar. De hecho, más de la mitad de la grasa

total consumida en la zona mediterránea procede del aceite de oliva (Waterman et al., 2007).

Estudios realizados en distintas poblaciones han puesto de manifiesto que la relación entre la ingesta de grasa y el riesgo de enfermedades cardiovasculares depende en gran medida de la calidad de la grasa, más que de su cantidad en la dieta. Por ejemplo, la dieta típica estadounidense incluye una gran cantidad de grasas saturadas procedentes de alimentos de origen animal, como la carne y los lácteos, mientras que en la dieta tradicional de los países de la cuenca mediterránea la mayor parte de las grasas eran de origen vegetal, y fundamentalmente ácidos grasos monoinsaturados incluidos en el aceite de oliva. También se ha comprobado que las diferencias en el grado de saturación de los ácidos grasos de estas dietas condicionaban los niveles de colesterol y el perfil lipoprotéico en sangre, lo que explicaría, al menos en parte, sus efectos en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Pérez et al., 2006).

Estudios posteriores han demostrado que, además de su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, el aceite de oliva virgen extra contiene otros muchos componentes, entre los que destacan los compuestos fenólicos, con una amplia gama de efectos beneficiosos para la salud, como su actividad antioxidante y antiinflamatoria (Visioli et al., 2002).

El aceite de oliva es sin duda un alimento de gran valor, pero muy rico en calorías, lo que nos podría llevar a pensar que su consumo podría favorecer la incidencia de obesidad. Sin embargo, los datos epidemiológicos demuestran que las poblaciones mediterráneas, que son las que consumen más aceite de oliva, sufren menos obesidad que las poblaciones de los países anglosajones por ejemplo, tres veces menos que en Estados Unidos (Waterman et al., 2007).

Diversos estudios han demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados ejercen una clara acción hipotensora. Partiendo de la observación de que la tasa de ECV y de HTA es más baja entre las poblaciones mediterráneas que en las demás poblaciones del mundo occidental, se ha formulado la hipótesis de que el mantenimiento de la PA dentro de los valores normales puede deberse a la elevada ingesta de ácidos grasos monoinsaturados a través del consumo habitual del aceite de oliva (Gilani et al., 2005; Waterman et al., 2007).

Hasta no hace mucho tiempo, las recomendaciones dietéticas para el tratamiento de los pacientes hipertensos consistían en la restricción de sal y en el control del peso corporal (dieta hipocalórica). El conocimiento que se tenía sobre la influencia de las grasas sobre la salud era realmente escaso, por lo que se reducía indiscriminadamente su consumo, debido al gran efecto desfavorable que se le atribuía debido a su gran riqueza calórica. En los últimos años se ha visto que las distintas grasas tienen acciones diferentes. En este sentido uno de los hechos más llamativos es la demostración de que el consumo de aceite de oliva, dentro de una dieta mediterránea, puede reducir la PA (Visioli et al., 2002).

1.10.1. COMPONENTES DEL ACEITE DE OLIVA. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NOMENCLATURA.

Desde un punto de vista químico, los componentes del aceite de oliva pueden clasificarse en dos grandes grupos: uno mayoritario, la fracción saponificable, y otro presente en menor proporción, los componentes minoritarios o fracción insaponificable. (Harwood et al., 2000; Montedoro et al., 2007).

Composición de la fracción saponificable

Esta fracción representa en general del 98,5 al 99,5%, la mayor parte de la cual son triglicéridos y en menor medida ácidos grasos libres junto con otros componentes minoritarios como mono o diglicéridos, fosfátidos, ceras y ésteres de esteroides. (Harwood et al., 2000).

Ácidos Grasos y Triglicéridos

Los triglicéridos (TG) son los constituyentes principales de todos los aceites y grasas conocidas. Están formados por una molécula de glicerol esterificada con ácidos grasos y sus propiedades biológicas vendrán definidas por el tipo de ácido graso que contengan en su composición (Montedoro et al., 2007).

Los ácidos grasos (AG) son compuestos hidrocarbonados con un grupo metilo terminal y un grupo carboxilo. Los ácidos grasos de interés biológico son aquellos que

contienen un número par de átomos de carbono y pueden clasificarse de acuerdo al número de carbonos o en función del grado de saturación de sus enlaces (Montedoro et al., 2007). De este modo, podemos hablar de:

- Ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos).
- Ácidos grasos de cadena media (8-12 carbonos).
- Ácidos grasos de cadena larga (14-18 carbonos).
- Ácidos grasos de cadena muy larga (≥ 20 carbonos).

Por otra parte, según el grado de saturación, los ácidos grasos se clasifican en:

- AG saturados, los cuales no presentan ningún doble enlace en su cadena. Su procedencia es fundamentalmente animal, aunque algunos aceites vegetales como los de coco y palma los contienen de manera significativa.
- AG monoinsaturados, estos poseen un único enlace en su cadena y se encuentra mayoritariamente en productos vegetales. El AG monoinsaturado más abundante, representativo y con unos efectos más evidentes sobre la salud es el ácido oleico, componente mayoritario del aceite de oliva. El efecto cardiosaludable de los ácidos grasos monoinsaturados es conocido, ya que pueden tener una acción beneficiosa sobre el perfil lipídico, además de antitrombogénica y antioxidante (Denke et al., 1993; Pocovi et al., 1998).
- AG poliinsaturados, estos presentan más de un doble enlace y, como en el caso anterior, pueden tener efectos antitrombogénicos e hipolipemiantes (Ronda et al., 1990; Denke, 1993).

El aceite de oliva es rico en ácido oleico (monoinsaturado), contiene cantidades moderadas de ácido palmítico y linoleico y un bajo porcentaje de ácidos esteárico y linolénico, tal como se ilustra en la tabla 6 (Montedoro et al., 2007).

Nombre común	Símbolo	Porcentaje (%)
Mirístico	(14:0)	0,0-0,05
Palmítico	(16:0)	7,5-20,0
Palmitoleico	(16:1 n7)	0,3-3,5
Margárico	(17:0)	0,0-0,3
Heptadecenoico	(17:1)	0,0-0,3
Esteárico	(18:0)	0,5-5,0
Oleico	(18:1 n9)	55,0-83,0
Linoleico	(18:2 n6)	3,5-21,0
Linolénico	(18:3 n3)	0,0-0,9
Araquídico	(20:0)	0,0-0,6
Eicosenoico	(20:1 n9)	0,0-0,4
Behénico	(22:0)	0,0-0,2
Lignocérico	(24:0)	0,0-0,2

Tabla 6. Porcentaje de los diferentes ácidos grasos presentes en el aceite de oliva.

Adaptada de Montedoro et al., 2007

La mayoría de los ácidos grasos están presentes en forma de triacilglicerol, los cuales constituyen el 98% de la composición total del aceite. La distribución de los ácidos grasos en estos triglicéridos sigue un patrón en el que el ácido graso que ocupa la posición central en la molécula de glicerol siempre es un ácido graso insaturado, generalmente el ácido oleico.

Composición de la fracción insaponificable

La fracción insaponificable está formada por los compuestos que se pueden obtener tras la saponificación del aceite. Esta fracción, también denominada componentes minoritarios del aceite de oliva, contiene una gran variedad de compuestos que cumplen una amplia diversidad de funciones y son responsables de la estabilidad del aceite y de sus características organolépticas. Estos componentes minoritarios se pierden en gran medida durante los procesos de refinado, y por lo tanto no estarán presentes en aceites de oliva corrientes si no se enriquecen con aceite de oliva virgen. La caracterización y determinación de estos compuestos constituye un campo muy activo de investigación en la actualidad, que presenta además una gran complejidad. En

la tabla 7 se recogen los principales grupos de compuestos junto con su rango de concentraciones en el aceite de oliva virgen (Montedoro et al., 2007).

Componentes minoritarios	Concentración (mg/kg)
Hidrocarburos	1500-8000
Escualeno	1250-8000
Carotenos	0,5-5
Luteína	3-15
Compuestos terpénicos	1000-3000
Esteroles	800-2600
Compuestos fenólicos	20-900
Alcoholes alifáticos	100-200
Tocoferoles	50-300
Clorofilas A y B	0,2-5
Feofitinas A y B	0,2-20

Tabla 7. Componentes minoritarios del aceite de oliva virgen. Adaptada de Montedoro et al., 2007

La acción biológica de algunas de estas sustancias es variable, y en los últimos años muchos estudios concentran su atención en los efectos beneficiosos de las mismas sobre la salud, por su posible actividad antioxidante, antihipertensiva, hipolipémica o antiaterogénica (Jones et al., 1997; Calabresse, 2002).

Hidrocarburos

Los hidrocarburos constituyen el 32-50% de la fracción insaponificable (Jiménez et al., 2001). Una de las grandes diferencias entre el aceite de oliva virgen y el resto de aceites es la composición en hidrocarburos entre los que destaca el escualeno y en mucha menor cantidad los carotenos (la luteína y el β -caroteno) (Owen et al., 2000).

- Escualeno

Es un hidrocarburo alifático insaturado, compuesto por 30 átomos de carbono, con seis dobles enlaces conjugados que aparecen en una elevada concentración en la fracción insaponificable del aceite de oliva (60-75%). Puede constituir hasta el 90% de los hidrocarburos en el aceite de oliva virgen, mientras que en los aceites refinados su concentración se reduce drásticamente (Jiménez et al., 2001). Es un precursor isoprenoide de la biosíntesis del colesterol y otros esteroides en plantas y animales.

También es un componente mayoritario de los lípidos de humanos (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Su presencia en la materia insaponificable puede llegar a alcanzar el 40% del peso total (Boskou, 1998; Owen et al., 2000).

- Carotenos

Son otra familia de compuestos presentes en la fracción de hidrocarburos del aceite de oliva virgen. Entre los mayoritarios encontramos la luteína (30-60%) y el β -caroteno (5-15%). Estos compuestos, además de proporcionar color a los vegetales que los contienen, poseen propiedades antioxidantes por su capacidad secuestrante del radical de oxígeno y de otros radicales libres. El β -caroteno en particular juega un papel importante como precursor de la vitamina A (Jiménez et al., 2001). La concentración de β -caroteno en el aceite de oliva es muy baja y oscila entre 0,03-0,5mg/100g (Kiritsakis et al., 1987). Otros hidrocarburos identificados en el aceite de oliva, aunque presentes en muy pequeña proporción, son el licopeno, que junto con el β -caroteno y las clorofilas confieren el color amarillento a verdoso típico del aceite, y algunos hidrocarburos aromáticos como el fenantreno, el antraceno y el pireno (Jiménez et al., 2001).

Compuestos terpénicos

El contenido total de compuestos terpénicos supone una de las fracciones más abundantes y pueden ser de estructura tetracíclica o pentacíclica. De entre estos últimos, destacan dos alcoholes, el uvaol y el eritrodiol, y sus correspondientes ácidos, oleanólico y maslínico. La presencia de eritrodiol y uvaol es más abundante en la piel del fruto. El interés por conocer el potencial biofarmacéutico de estos compuestos ha crecido en los últimos años. Otros compuestos terpénicos son los alcoholes triterpénicos que presentan una estructura tetra o pentacíclica (Cert et al., 1999).

Esteroles

Se han identificado más de 40 fitoesteroles y su concentración en el aceite de oliva oscila entre 80 y 265mg/100g (Kiritsakis et al., 1987; Jiménez et al., 2001). Los fitoesteroles son los homólogos en plantas del colesterol en animales, siendo los más abundantes en el aceite de oliva virgen: el β -sitosterol (75-90%), el Δ^5 -avenasterol (5-36%) y el campesterol (aproximadamente 3%). Son compuestos derivados del escualeno cuya característica común es la presencia del anillo esterol, diferenciándose

entre ellos en la cadena lateral. Su función principal es estructural, ya que son constituyentes de las membranas celulares vegetales, aunque algunos de ellos presentan también una cierta acción hormonal (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Fisiológicamente, la importancia de estos compuestos radica en su capacidad hipolipemiente, ya que interfiere competitivamente en la absorción intestinal del colesterol dietético (Jones et al., 1997).

Compuestos fenólicos

Forman parte de la fracción polar y afectan a la estabilidad y sabor del aceite de oliva. El rango oscila normalmente de 50 a 200 mg/ kg de aceite, aunque hay aceites con cantidades de fenoles superiores a 1000 mg/ kg de aceite. (Jiménez et al., 2001). Participan en las propiedades organolépticas del aceite y muchos de estos compuestos presentan propiedades antioxidantes. La mayor contribución a este efecto se atribuye al hidroxitirosol (Visioli et al., 2002).

- *Fenoles simples*: En este grupo se encontrarían compuestos alcohólicos (el hidroxitirosol, el tirosol y el 4-etilfenol), ácidos (vanílico, el ácido p-cumárico, el ácido ferúlico, cafeico, sináptico, protocatéquico, gálico, siríngico), esterres (los acetatos de tirosilo o de hidroxitirosilo), etc.
- *Polifenoles*: Con esta estructura se han hallado los flavonoides: apigenina y luteolina.
- *Secoiridoides*: En esta categoría se encuadran: la oleuropeína glicosilada, la dimetiloleuropeína y la deacetoxioleuropeína, entre otros.

Alcoholes alifáticos

Esta fracción está constituida por alcoholes saturados de cadena lineal con número par de átomos de carbono y con longitudes entre 18 y 28 átomos de carbono. Los mayoritarios son el hexacosanol, octacosanol y tetracosanol. Estos alcoholes, al igual que los esterres y los alcoholes triterpénicos, pueden unirse con ácidos grasos y constituir los ésteres no glicéridos.

Tocoferoles

Los tocoferoles son también integrantes de la fracción insaponificable. El más abundante entre ellos es el α -tocoferol que supone el 52-87% del total de los tocoferoles, y el más activo biológicamente como vitamina E. También están presentes el β -tocoferol (15-20%) y γ -tocoferol (7-23%). La concentración promedio de tocoferoles en el aceite de oliva se sitúa entre 150-200 mg/kg (Jiménez et al., 2001). Los tocoferoles contribuyen a dar estabilidad al aceite y desempeñan un papel biológico beneficioso en la salud por su actividad antioxidante. Pueden capturar radicales libres gracias al grupo hidroxilo libre presente en el anillo aromático. El vitámero más abundante es el α , que presenta una mayor actividad biológica como vitamina E (Jiménez et al., 2001).

Clorofilas

La fracción clorofílica la integran las clorofilas a y b y sus derivados libres de magnesio, las feofitinas a y b. En el aceite de oliva virgen son mayoritarias la feofitina a (20-40%) y la clorofila a (4-7%). El color del aceite de oliva se debe principalmente a estos compuestos. En ausencia de luz las clorofilas podrían actuar como antioxidantes débiles, pero en su presencia estos compuestos pueden ser fuertes promotores de oxidación (Montedoro et al., 2007).

1.10.2. INFLUENCIA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN LA PRESIÓN ARTERIAL

Al comienzo de este trabajo hemos indicado la importancia que la HTA tiene como enfermedad a nivel mundial; y sus causas desencadenantes, cuyo conocimiento es de primordial importancia para su prevención.

Una de las estrategias preventivas es la ingesta de alimentos saludables, y por tanto podríamos afirmar que la intervención dietética puede considerarse un pilar esencial que coadyuvaría al tratamiento contra la HTA. El consumo de grasas monoinsaturadas, y especialmente el aceite de oliva virgen, favorecen los niveles de presión adecuados, o disminuyen el riesgo de padecer HTA.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Wangesteen et al., 2010), observamos que dietas altas en grasa se han relacionado con la obesidad, la hipertensión y el desarrollo de síndrome metabólico. Con el fin de estudiar estos efectos, grupos de ratas fueron alimentadas con tres tipos de dietas: estándar para roedores de laboratorio, enriquecida con aceite de oliva virgen y enriquecida con mantequilla durante un periodo de seis meses. Después del periodo experimental, el peso corporal de los animales alimentados con la dieta mantequilla fue mayor que el de los grupos aceite de oliva o estándar, aunque los tres grupos mostraron la misma ingesta energética. La PAS, NO sérico total y la expresión NOSi también se incrementaron en las ratas del grupo mantequilla. Curiosamente, el grupo de aceite de oliva mostró menores niveles séricos de NO que los animales del grupo estándar. Este estudio demuestra que la ingesta a largo plazo de una dieta rica en aceite de oliva virgen tiene importantes efectos sobre el peso corporal y las funciones vasculares, lo que podría ayudar a entender el papel protector de la dieta mediterránea frente a la obesidad y la HTA (Wangesteen et al., 2010).

Hace unos años las recomendaciones dietéticas para el tratamiento de los pacientes hipertensos consistían principalmente en la disminución del consumo de sal y en el control del peso corporal. Esto era así porque el conocimiento que hasta entonces se tenía sobre la influencia de las grasas en la salud era realmente escaso. Sin embargo, se ha producido un cambio drástico en los últimos años, ya que se ha comprobado en numerosos experimentos que las distintas grasas tienen acciones diferenciadas. En este sentido, uno de los hechos más llamativos es la demostración de que el consumo de aceite de oliva, dentro de una dieta mediterránea, puede contribuir a reducir la presión arterial. Segarra et al., en 2008 demostraron que una ingesta alta en grasas monoinsaturadas (MUFA) podría ser un factor dietético capaz de disminuir la incidencia de enfermedad cardiovascular e hipertensión además de demostrar que un aumento de la saturación de la grasa de la dieta resulta en un aumento de las concentraciones de colesterol total (CT) en plasma y mayores niveles de PA (Segarra et al., 2008).

Son muchas las investigaciones que durante los últimos años se han llevado a cabo sobre los beneficios para la salud del aceite de oliva virgen, basadas mayoritariamente en su composición en ácidos grasos monoinsaturados (en concreto el ácido oleico) y compuestos antioxidantes, aunque los resultados publicados más

recientemente están dirigidos a analizar las propiedades para la salud de los componentes minoritarios.

Al igual que ocurre con otros aspectos de las ECV, también se ha visto que hay una reducción en la incidencia de la hipertensión en las poblaciones que consumen la dieta mediterránea, y la adhesión a ésta es inversamente proporcional a los valores de presión arterial sistólica y diastólica. Varios estudios han demostrado las propiedades antihipertensivas del aceite de oliva virgen extra, tras la administración intravenosa de extracto de aceite de oliva, que reduce tanto la PAS como la PAD, al igual que la PA media en ratas normotensas (Waterman et al., 2007).

Existen datos epidemiológicos obtenidos a partir de estudios realizados en tres países mediterráneos (Italia, Grecia y España) y en países no pertenecientes a la cuenca mediterránea, donde se comprueba la existencia de un efecto protector de los ácidos grasos monoinsaturados del aceite de oliva virgen extra. En el año 2000, Ferrara y colaboradores, compararon una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (a partir de aceite de girasol) con una dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados (a partir de aceite de oliva virgen extra) en pacientes con tratamientos antihipertensivos, comprobando que las personas que consumían aceite de oliva virgen extra en la dieta eran capaces de reducir la dosis de medicación antihipertensiva (Ferrara et al., 2000).

Como ya hemos visto, el endotelio desempeña un papel clave en la regulación del tono vascular mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. En la HTA, una de las principales causas es la disfunción endotelial con una menor disponibilidad de NO. El estrés oxidativo, a través de la producción de anión superóxido disminuye la disponibilidad de NO, ocasionando una inhibición de la expresión de la NOS. El efecto antioxidante del aceite de oliva virgen extra y de sus componentes menores, podría ser responsable del efecto protector del aceite de oliva virgen sobre el aumento de los niveles de PA. En este sentido, los efectos antihipertensivos también se han comprobado para otros polifenoles dietéticos, como los polifenoles del vino tinto, que han demostrado ser capaces de mejorar la expresión de la NOS en cultivos de células endoteliales (Covas, 2007).

El papel de los compuestos fenólicos del aceite de oliva en el control de la vasodilatación dependiente del endotelio ha sido recientemente descrito. El grupo de Ruano et al., en 2005 demostraron que una ingesta con alto contenido en compuestos fenólicos procedentes del aceite de oliva virgen extra mejora la vasodilatación

dependiente del endotelio en estado postprandial, siendo este efecto superior al de una ingesta que incluyera un aceite de oliva similar, pero con bajo contenido en compuestos fenólicos. Por lo tanto, los beneficios del aceite de oliva virgen extra y sus compuestos fenólicos sobre la PA podrían estar mediados a través de su efecto protector sobre la función endotelial vascular (Covas, 2007).

El mecanismo por el cual el aceite de oliva virgen extra es capaz de reducir la PA es desconocido, aunque se han propuesto varias teorías (Waterman et al., 2007). En primer lugar, aunque el número de estudios es escaso, parece que un alto consumo de ácidos grasos monoinsaturados modifica los fosfolípidos de membrana lo que, a su vez, altera la regulación de la PA conduciéndolos a niveles más bajos. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que una molécula derivada del ácido oleico, el 2 - hidroxioleico, produce un importante efecto antihipertensivo. Los autores de este estudio observaron que dicho efecto podría estar mediado a través de modificaciones en las proteínas de membrana (Alonso et al., 2006).

Otros estudios han sugerido distintos mecanismos para explicar el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados sobre la PA. El contenido en compuestos polares de los aceites de cocina, como resultado de la degradación durante el proceso de cocción, se asocia directamente con los niveles de PA. La utilización de aceite de oliva como aceite de cocina reduce la formación de estos compuestos polares. Por otra parte, el consumo de aceite de oliva está también directamente relacionado con el contenido en ácidos grasos monoinsaturados de los fosfolípidos de membrana, lo que a su vez se asoció inversamente con los niveles de PA (Soriguer et al., 2003).

Hay estudios que concluyen que el aceite de oliva virgen extra es un antagonista de los canales de calcio, imitando los efectos de los bloqueadores del canal de calcio, como por ejemplo el Verapamil. Otro mecanismo que ha sido sugerido es la disminución del tono vascular, y cambios en la composición de ácidos grasos y fosfolípidos de la aorta (Waterman et al., 2007).

Los receptores adrenérgicos son también elementos clave en el control central y periférico de la PA. Estudios recientes han demostrado que la actividad de la vía de señalización de los receptores adrenérgicos puede ser regulada por el ácido oleico (cis-18:1 n-9), específicamente debido a los efectos de este ácido graso sobre la estructura de las membranas celulares. Sin embargo, esta modulación en la señalización del receptor de la proteína G unida a membrana no es producida por otros ácidos grasos

estructuralmente diferentes, pero muy estrechamente relacionados, como ácido eláidico (trans-18:1 n-9) o el ácido esteárico (18:0). Sin embargo, un análogo estructural del ácido oleico, el ácido 2-hidroxioléico, sí puede regular la estructura de los lípidos de membrana y la señalización celular de forma similar a como lo hace el ácido oleico. A nivel molecular, el ácido oleico y el aceite de oliva virgen regulan la proteína G, tanto *in vivo* como *in vitro*. Curiosamente, el efecto hipotensor del ácido 2-hidroxioléico implica cambios en las mismas vías de señalización que el ácido oleico (Terés et al., 2008).

Muy pocos estudios han abordado hasta el momento los efectos a largo plazo del consumo de aceite de oliva sobre la función endotelial. Esposito et al., en 2004 llevaron a cabo un ensayo aleatorio entre 180 sujetos con síndrome metabólico a los que se les instruyó para seguir una dieta mediterránea, incluyendo como grasa principal el aceite de oliva virgen extra. Después de 2 años de seguimiento, se observó una gran mejoría de la función endotelial y una reducción en los niveles de PA. También describieron una reducción significativa de los marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva e IL-6, IL-7 e IL-18, además de la disminución en las concentraciones plasmáticas de colesterol total y LDL. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el aceite de oliva virgen extra de la dieta da lugar a estos cambios, y cuáles son los componentes reales del aceite de oliva virgen extra responsables de tales efectos no están aún bien aclarados (Perona et al., 2006).

Hipótesis y Objetivos

La hipertensión Arterial es actualmente uno de los principales problemas de salud pública, tanto en los países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo. La importancia clínica del aumento sostenido en los valores de Presión Arterial radica en su vinculación como factor de riesgo con las enfermedades cardiovasculares, principal causa de mortalidad en el mundo. A pesar de ello, los mecanismos fisiológicos que participan en el desarrollo de la hipertensión aún no han sido suficientemente aclarados, en particular aquellos que subyacen a la aparición de la llamada hipertensión esencial, que es la que afecta a la mayoría de los pacientes hipertensos.

Dentro de los mecanismos fisiológicos que participan en la regulación homeostática de los valores de Presión Arterial, el Sistema Renina Angiotensina es uno de los más importantes, implicado en el mantenimiento de dichos valores tanto a medio como a largo plazo. Desde hace tiempo, sabemos que en dichos procesos no sólo interviene el Sistema Renina Angiotensina sistémico o circulante, sino también las distintas angiotensinas que se generan localmente en diversos tejidos y órganos, entre los que cabe destacar el cerebro y el riñón. Por otro lado, dichos sistemas no regulan los valores de Presión Arterial de manera aislada o independiente, sino que interactúan con otros mecanismos fisiológicos, entre ellos el Sistema Nervioso Simpático y el del Óxido Nítrico, siendo de especial interés el estudio del equilibrio entre los mecanismos vasoconstrictores y los vasodilatadores.

Por último, es conocido que la hipertensión, al igual que otras enfermedades crónicas degenerativas, es de tipo multicausal, y en ella intervienen tanto factores genéticos como variables ambientales. Dentro de las variables ambientales, sin lugar a dudas la alimentación juega un importante papel, estando demostrado que determinados patrones, como la llamada dieta mediterránea, pueden ayudar a prevenir la aparición de hipertensión arterial y por lo tanto la incidencia de enfermedades cardiovasculares. De los componentes de la dieta mediterránea, el aceite de oliva ha sido ampliamente estudiado por su papel preventivo frente a la aparición de patologías cardiovasculares, sin que hasta el momento se conozcan en profundidad sus efectos concretos sobre los mecanismos de regulación de la Presión Arterial.

HIPÓTESIS

Partiendo de estas premisas, nuestra hipótesis se basaría en que el bloqueo farmacológico de los Sistemas Renina Angiotensina, de la actividad simpática o de la producción de óxido nítrico en un modelo animal de hipertensión genética, podría afectar a las actividades aminopeptidasas implicadas en el metabolismo de las angiotensinas en plasma y en distintos tejidos, lo cual se manifestaría no sólo en cambios en los valores de Presión Arterial, sino también en otras variables fisiológicas como el incremento de peso corporal o la regulación de la glucemia. Por otro lado, la administración con la dieta de aceite de oliva virgen extra con anterioridad al establecimiento de la hipertensión, podría colaborar en el mantenimiento de los valores de Presión Arterial dentro de la normalidad. Este efecto, podría estar provocado por modificaciones en el metabolismo de las angiotensinas.

OBJETIVOS

En base a dicha hipótesis, en el diseño del presente estudio se plantearon como objetivos generales:

- 1.- El análisis de los efectos del bloqueo de los Sistemas Renina Angiotensina mediante la administración de un fármaco antihipertensivo inhibidor del ECA (captopril), en un modelo genético de hipertensión (ratas SHR), sobre la evolución de los valores de Presión Arterial, así como sobre otras variables fisiológicas y metabólicas; y su relación con cambios en las actividades aminopeptidasas que participan en el metabolismo de las angiotensinas en el plasma, hipotálamo y riñón.
- 2.- El análisis de los efectos de la administración de un β -bloqueante, el propranolol, sobre los parámetros y actividades enzimáticas indicados anteriormente, con el fin de estudiar la interacción de los Sistemas Renina Angiotensina y el Sistema Nervioso Simpático en el mantenimiento de la hipertensión de tipo SHR.
- 3.- El análisis de los efectos, sobre los parámetros y actividades indicados, del bloqueo de la síntesis de NO mediante la administración de L-NAME a ratas SHR, con el objeto de estudiar el efecto modulador del NO sobre la hipertensión SHR, y la interacción entre los efectos vasoconstrictores de las angiotensinas y vasodilatadores del NO.
- 4.- El análisis de los posibles efectos protectores de la administración de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra sobre la evolución de los valores de Presión Arterial en ratas SHR, de manera previa al establecimiento de la hipertensión, y su relación con los cambios en las actividades aminopeptidasas que participan en el metabolismo de las angiotensinas del Sistema Renina Angiotensina periférico y de los sistemas locales en cerebro y riñón.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. ANIMALES

Para la realización del presente estudio se utilizaron un total de 48 ratas macho genéticamente hipertensas (Spontaneously Hypertensive Rats: SHR), con pesos iniciales comprendidos entre los 100 -150 gramos y de 4-5 semanas de edad, procedentes de Harlan Laboratories. Durante todo el periodo experimental los animales fueron mantenidos en el Servicio de Animalario de la Universidad de Jaén, bajo condiciones estándar de luz, humedad y temperatura, según el Real Decreto 1201/2005 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y el acuerdo llevado a cabo según las directivas europeas 86/609/CEE.

3.1.2. EQUIPO DE ANÁLISIS

- Agitador magnético (A-06 serie H, SBS)
- Agitador de tubos (Velp Scientifica)
- Balanza romana
- Balanza digital (Soehnle. ULTRA 2.0)
- Balanza de precisión (SBC 21, Scaltec)
- Jaula aclimatada
- Jaulas metabólicas
- Centrifugadora (Digicen 20-R)
- Espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA)
- Espectrofotómetro (FLUOstar OPTIMA)
- Homogenizador (Heidolph)
- Estufa para placas (Shaker DTS-4)
- Estufa
- Medidor de la presión arterial (Letica, digital Pressure Meter LE 5000)
- pHmetro (Crison)

- Rotor (Mod. 50Ti, Beckman)
- Rotor orbital (FALC. MOD. F200)
- Ultracentrífuga (Beckman Ultra)
- Aparato de medición de glucosa en sangre y tiras reactivas (Glucocard Memory)

3.1.3. PRODUCTOS QUÍMICOS

- Acetato sódico anhidro (Panreac Laboratories)
- Ácido acético 96% (Panreac Laboratories)
- Ácido clorhídrico (Panreac Laboratories)
- Ácido fosfórico (Panreac Laboratories)
- Ácido fosfotúngstico (Spinreact)
- Albumina bovina (BSA) (Sigma)
- Ácido pícrico (Spinreact)
- Bio-beads SM-2 (Bio-Rad Laboratories)
- Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma)
- Colesterol esterasa (CHE) (Spinreact)
- Colesterol oxidasa (CHOD) (Spinreact)
- Cloruro amónico (Panreac Laboratories)
- Cloruro cálcico anhidrido (Sigma)
- Cloruro magnésico (Spinreact)
- Cloruro sódico (Panreac Laboratories)
- Captopril (Laboratorio Fragon)
- Dihidrógenofosfato de sodio (di-hidrato) (Merck)
- D-(+)-Glucose, Sigma Ultra, 99,5% GC (Sigma)
- D-L-Dithiothreitol, minimum 99% titration (DTT) (Sigma)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac Laboratories)
- Equitensin

- Etanol 96% (Panreac Laboratories)
- Fosfato sódico dibásico dodecahidratado (Merck)
- Gentamicina (Laboratorios Normon)
- Glicerol quinasa (GK) (Spinreact)
- Glicerol-3-oxidasa (GPO) (Spinreact)
- Glucosa oxidasa (GOD) (Spinreact)
- Heparina (Analema)
- Hidrato de cloral (Merck)
- Hidróxido sódico (Spinreact)
- Kit. Óxido Nítrico total. (Assay designs. Stressgen)
- Kit 8-Isoprostano. EIA (Cayman Biotechnology)
- Lipoprotein lipasa (LPL) (Spinreact)
- L-alanil- β -naftilamida (Sigma)
- L-aspartil- β -naftilamida (Bachem)
- L-cystinil- β -naftilamida (Sigma)
- L-glutamil- β -naftilamida (Bachem)
- Nembutal (Sigma)
- N-nitro-L-arginina metil éster clorhidrato (L-NAME) (Fluka)
- Peroxidasa (POD) (Spinreact)
- Propranolol (Laboratorio Fragon)
- Propilenglicol (Merck)
- Solución Bradford (Sigma)
- Sulfato de magnesio (Merck)
- Tritón - X- 100 (Sigma)
- Trizma base minimum 99,9% titration (Sigma)

3.1.4. DISOLUCIONES

- **Tampones:**

a) *Tampón TRIS-HCl: 50mM pH 7,4*

Para la preparación de 1000 ml: se toman 6,054gr de Trizma base (Tris (hidroximetil) amino metano) se disuelven en un vaso de precipitado con agua destilada (aproximadamente 700 ml). Una vez disuelto, se ajusta el pH con ácido clorhídrico (HCl), hasta conseguir un pH 7,4. Se vierte en un matraz y se completa hasta 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4 ° C.

b) *Tampón TRIS-HCl: 50mM pH 6*

Para obtener la solución de trabajo: se toman 6,054gr de Trizma base (Tris (hidroximetil) amino metano) se disuelven en un vaso de precipitado con agua destilada (aproximadamente 700 ml). Una vez disuelto, se ajusta el pH con ácido clorhídrico (HCl), hasta conseguir un pH 6. Se vierte en un matraz y se completa hasta 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4 ° C.

c) *Tampón TRIS-TRITÓN*

Para obtener la solución de trabajo: se toman 49,5ml del tampón Tris-HCl 50mM con pH 6 y se le añade 0,5 ml de Tritón-X-100. Almacenar a 4 ° C.

d) *Tampón FOSFATO: 50 mM pH 7,4*

Para la preparación de 1000 ml: se toman 13,4 gr de hidrógeno fosfato monosódico y se le añade 7,8 gr de dihidrógeno fosfato sódico. Se mezclan en un vaso de precipitado con agua destilada (aproximadamente 700 ml). Una vez que disuelto, se ajusta el pH hasta conseguir un pH 7,4. Se vierte en un matraz y se completa hasta 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4 ° C.

e) Tampón ACETATO: 0,1 M pH 4,2

Para obtener la solución de trabajo: se toman 8,203 gr de acetato sódico y se le añaden 5,9 ml de ácido acético. Se mezclan en un vaso precipitado con agua destilada (aproximadamente 700 ml). Una vez disuelto, se ajusta el pH, hasta conseguir un pH 4,2. Se vierte en un matraz y se afora hasta 1000 ml con agua destilada. Almacenar a 4° C.

- **Reactivo de Bradford**

Concentrado de solución: Azul brillante de Coomassie G-250 (100 mg), etanol (50 ml), Ácido fosfórico (100 ml) y Agua destilada (50 ml).

Solución stock: Filtrar la solución concentrada. Para preparar 100 ml: Tomar 20 ml de la solución concentrada y llevar a 100 ml (diluido 5 veces) con agua destilada. Almacenar a 4° C.

- **Solución Patrón de Albúmina Sérica Bovina (1mg/ml)**

Para la preparación de la curva patrón de albúmina bovina (BSA), se pesan 10 mg de BSA y se disuelven en 10 ml de agua destilada.

- **Solución Salina 9 ‰**

Se toman 9 gr de cloruro sódico (NaCl) y se diluyen en 1000 ml de agua destilada. Almacenar a 4 ° C.

- **Equithensin**

Para prepara 100 ml se pesa 4,5 gr de Hidrato de cloral. Disolver en etanol (9,88 ml). Agitar suavemente para disolver y añadir: Nembutal (0,972 gr) y agua destilada (16,2 ml). Agitar para disolver y añadir: Propilenglicol (39,6 ml) y sulfato de magnesio (2,126 gr). Agitar en el agitador magnético caliente para disolver y una vez frío, completar hasta 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4 ° C.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. GRUPOS EXPERIMENTALES.

Se utilizaron un total de 48 ratas macho albinas procedentes de una colonia obtenida del NIH, Bethesda, EE.UU. genéticamente hipertensas (Spontaneously Hypertensive Rats: SHR), con pesos comprendidos entre 100 -150 gramos y con entre 4-5 semanas de edad.

A los animales se les proporciono unas condiciones adecuadas de alojamiento, medio ambiente, cierto grado de libertad de movimientos, alimentación, bebida y cuidados que aseguraron su salud y bienestar. Durante todo el periodo experimental fueron mantenidas bajo condiciones estándar de luz, humedad y temperatura, según el Real Decreto 1201/2005 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y el acuerdo llevado a cabo con las directivas europeas 86/609/CEE. Además, el proyecto fue revisado y aprobado por el comité de bioética de la Universidad de Jaén.

Se establecieron los siguientes grupos de trabajo:

- **Grupos con tratamiento farmacológico.**
 - 1º grupo: Ratas genéticamente hipertensas sin tratar (Control) (n=8).
 - 2º grupo: Ratas genéticamente hipertensas tratadas por vía oral con un inhibidor del ECA: Captopril 100 mg/Kg PV/día (n=8) (Villarejo et al., 2012).
 - 3º grupo: Ratas genéticamente hipertensas tratadas por vía oral con un beta-bloqueante: Propranolol 100 mg/Kg PV/día (n=8) (Sokolis et al., 2010; Sato et al., 2010).
 - 4º grupo: Ratas genéticamente hipertensas tratadas por vía oral con un inhibidor de la formación de óxido nítrico: L-NAME 3,5 mg/Kg PV/día (n=8) (Segarra et al., 2010).

- **Grupos con diferentes tipos de dietas.**

- 1º grupo: Ratas genéticamente hipertensas alimentadas con una dieta estándar (n=8).
- 2º grupo: Ratas genéticamente hipertensas alimentadas con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra (n=8).

Grupos con tratamiento farmacológico.

Se establecieron 4 grupos, constituidos con 8 animales, cada uno de los cuales recibió un determinado tratamiento farmacológico, con el objeto de analizar los posibles efectos de fármacos antihipertensores e inhibidores de la formación de óxido nítrico.

- 1º grupo: Ratas genéticamente hipertensas sin tratar. Este grupo estuvo expuesto durante todo el proceso de experimentación a un tratamiento placebo.
- 2º grupo: Ratas genéticamente hipertensas tratadas con un fármaco inhibidor del ECA (Captopril).
- 3º grupo: Ratas genéticamente hipertensas tratadas con un antagonista competitivo de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos, sin actividad simpaticomimética intrínseca (Propranolol).
- 4º grupo: Ratas genéticamente hipertensas tratadas con L-NAME, un inhibidor no selectivo de la óxido nítrico sintasa.

Previamente a la aplicación de estos tratamientos, se dejó transcurrir aproximadamente un mes (hasta las 7-8 semanas de vida) para permitir el desarrollo de la hipertensión en todos los grupos de animales (Safar et al., 2001).

Los distintos fármacos se administraron durante un mes (30 días), periodo durante el cual se llevó a cabo el control de distintos parámetros fisiológicos, tales como los valores de presión arterial sistólica (PAS), ingesta de agua, alimento y diuresis, así como el incremento en el peso corporal (Segarra et al., 2010; Segarra et al., 2012; Villarejo et al., 2012). El registro de dichos parámetro se realizó al inicio del periodo

experimental (previo a la administración de los fármacos), pasados 15 días de tratamiento y al final el proceso experimental (previo al sacrificio de los animales).

Concluido el periodo experimental se procedió al sacrificio de los animales bajo anestesia, con el fin de obtener las correspondientes muestras de sangre y tejidos.

Grupos con tratamiento dietético.

Se establecieron 2 grupos, constituidos con 8 animales, a cada uno de los cuales se le administró un determinado tipo de dieta. De los 48 animales, 16 de ellos fueron distribuidos en los siguientes grupos:

- 1º grupo: se les administró una dieta estándar para roedores de laboratorio cuya composición aparece descrita en la tabla 8.

COMPOSICIÓN DE LA DIETA	PORCENTAJE
Proteína	16,1%
Grasas	3,1%
Hidratos de Carbono	80,8%
Minerales	5,1%
Fibra	3,9%

Tabla 8. Composición de la dieta estándar.

Los ingredientes del pienso fueron: cebada, trigo, maíz, torta de soja, salvado de trigo, soluble de pescado concentrado, fosfato bicálcico, carbonato de calcio, premezclas de vitaminas (Vitamina A, D₃ y E) y de oligoelementos.

- 2º grupo: Ratas genéticamente hipertensas alimentadas durante todo el proceso experimental con una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra, cuya composición se encuentra descrita en la tabla 9. Las dietas se preparaban cada dos semanas y se mantenían en cámara fría y en oscuridad.

COMPOSICIÓN DE LA DIETA	PORCENTAJE
Proteína	12,9%
Grasas	23,1%
Hidratos de Carbono	64,6%
Minerales	4,1%
Fibra	3,1%

Tabla 9. Composición de la dieta experimental.

En la composición del aceite de oliva podemos destacar una fracción saponificable, la cual comprende el 98-99% en el total de su peso, constituida por los triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos, cuyo contenido en los principales tipos de ácidos se muestran en la tabla 10.

ÁCIDO GRASO		PORCENTAJE
Ácido oleico	C18:1	75,5 %
Ácido palmítico	C16:0	11,5 %
Ácido linoléico	C18:2	7,5 %

Tabla 10. Composición de la fracción saponificable

Y una fracción insaponificable, la cual constituye el 1,5 % en el total de su peso. Comprendiendo hidrocarburos, alcoholes, esteroides y tocoferoles. Podemos destacar otros componentes menores, como son los polifenoles (relacionados con el sabor del aceite), los pigmentos clorofílicos y carotenoides (relacionados con el color) y los compuestos volátiles (responsables del aroma).

La administración de las dietas se inició previamente al desarrollo de la hipertensión, aproximadamente a las 4-5 semanas de vida de los animales (Engler et al., 1998). El periodo experimental se prolongó durante 12 semanas, durante las cuales se controlaron diariamente los niveles de ingesta de agua y alimento. Durante el primer mes, se llevó a cabo el control semanal de distintos parámetros fisiológicos, tales como los valores de PAS, la ingesta de agua y alimento, así como el incremento de peso corporal, al igual que la diuresis. Posteriormente, durante los dos meses restantes, se llevo a cabo un control quincenal.

3.2.2. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL.

La PA se midió mediante el método de pletismografía “tail-cuff” (manguito de cola). Se introduce a los animales en una jaula aclimatada a 37°C durante 15-20 minutos, para que la arteria caudal de la cola se dilate. Posteriormente, el manguito de presión se coloca en la cola y, junto a éste, el sensor de las pulsaciones. El manguito se infla hasta alcanzar los 250 mmHg, para que de ésta forma se colapse la arteria caudal. A continuación, se comienza a aflojar el manguito hasta que se encienda un testigo

luminoso, indicativo de la aparición de turbulencias en el flujo sanguíneo. En este momento, la medida que marcaba el aparato se corresponde con el valor la presión arterial sistólica. En cada sesión se llevaron a cabo al menos siete determinaciones de PA. Se consideró como valor de PA sistólica la media de los tres valores menores dentro de un rango de 5 mmHg (Prieto et al., 2001).

A los animales con tratamiento farmacológico se les realizó la medida de la PA antes de comenzar el tratamiento, a mitad del periodo experimental y al finalizar el mismo, utilizando el procedimiento descrito anteriormente. A los dos grupos de animales con tratamiento dietético se les midió le PA de forma semanal durante el primer mes de experimento y durante los dos meses restantes se les midió cada quincena.



Imagen 1. Método de Pletismografía.



Imagen 2. Medida de la PA.

3.2.3. ENSAYOS DE BALANCE METABÓLICO.

Se utilizaron jaulas metabólicas para el registro individual de la ingesta de alimento y agua así como para la recogida de orina. Cada animal se ubicó individualmente en una jaula metabólica, en condiciones de temperatura y humedad constantes ($21^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $55\% \pm 10\%$, respectivamente) y un ciclo diario de doce horas de luz y doce de oscuridad, con acceso *ad libitum* al agua y al alimento. Los animales permanecieron en estas jaulas metabólicas durante 4 días, dos días para aclimatarse al nuevo entorno y otros dos días para la recogida de muestras. Las muestras de orina se recogían el último día de estancia en las jaulas metabólicas, en probetas graduadas con 1 ml de antibiótico (Gentamicina) para evitar de esta manera la contaminación de la muestra e inhibir el crecimiento de bacterias.

Con los grupos que siguieron tratamiento farmacológico se realizó un único periodo de balance, justo antes de la finalización del experimento, para tomar el registro individual de la ingesta de alimento y agua, así como la recogida de orina.

Durante todo el periodo experimental, los bebederos (biberones) eran rellenados con agua a la que se añadía el fármaco correspondiente, ajustando la dosis diariamente según el peso del animal. Los comederos y bebederos eran pesados antes de situarlos en las jaulas metabólicas, y pasadas 24 h eran retirados y vueltos a pesar para controlar la ingesta de alimento y bebida.



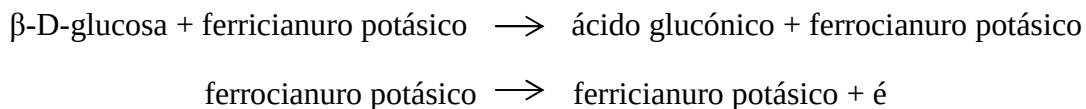
Imagen 3 y 4. Jaulas metabólicas donde se llevaron a cabo los ensayos de balance metabólico.

Los grupos que siguieron el tratamiento dietético llevaron un control más riguroso, realizándose un periodo de balance cada semana durante el primer mes, y cada quincena durante los dos meses restantes. Durante todo el experimento los animales fueron alimentados ad libitum, cada grupo con su dieta respectiva.

3.2.4. CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.

Para verificar la forma en la que el organismo utiliza la glucosa se utilizó la prueba de tolerancia a la glucosa vía intraperitoneal. Para la determinación de los valores de glucosa en sangre se empleó un glucómetro, marca Glucocard Memory 2. La glucosa de la muestra reacciona con la glucosa oxidasa (GOD) y el ferricianuro potásico de la tira, dando lugar a ferrocianuro potásico. El ferrocianuro potásico producido es

proporcional a la concentración de glucosa de la muestra. Mediante oxidación, el ferrocianuro potásico produce una corriente eléctrica, que el medidor convierte en la concentración glucosa.



En los dos grupos correspondientes a los tratamientos dietéticos (estándar y dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra), se llevó a cabo la determinación de las curvas de tolerancia a la glucosa al final del periodo experimental. Previamente, se pesó a cada uno de los animales, para poder ajustar la dosis de glucosa que se le iba a inyectar.

Los animales se introducían en una jaula aclimatada a 37°C durante 15-20 minutos, para que la arteria caudal de la cola se dilatara y así facilitar la visión de la arteria para el momento de la punción. Los animales se mantuvieron en ayunas durante las 24 horas previas.

Se preparó una solución con 13,3 gr de glucosa en 20 ml de agua destilada. A cada animal se le inyectó la dosis correspondiente por vía intraperitoneal. Se determinaron los niveles de glucosa en sangre previos a la sobrecarga y a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. posteriores.



Imagen 5. Inyección de la solución de glucosa por vía intraperitoneal.



Imagen 6. Medida de los niveles de glucosa en sangre.

3.2.5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLASMA SANGUÍNEO.

Transcurridas cuatro semanas de administración de los distintos fármacos (Captopril, Propranolol y L-NAME), los animales se anestesiaron intraperitonealmente con equitensín (2ml/kg de peso corporal). Se procedió a la apertura de la cavidad torácica y a la extracción de muestras de sangre por punción del ventrículo izquierdo. A cada una de las muestras se le añadió heparina para evitar su coagulación y se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min para obtener el plasma (Segarra et al., 2010; Segarra et al., 2012; Villarejo et al., 2012).



Imagen 7. Apertura de la cavidad torácica y extracción de la muestra de sangre por punción en el ventrículo izquierdo.

En el caso de los grupos con tratamiento dietético, pasadas las 12 semanas de periodo experimental, y tras mantener a los animales en ayuno 12 horas, se procedió a su sacrificio. Se anestesiaron intraperitonealmente con equitensín (2ml/kg peso corporal) y se extrajeron las muestras de sangre por punción del ventrículo izquierdo. Se añadió heparina a cada una de las muestras para evitar su coagulación y se centrifugaron a 5000 x g durante 10 min para obtener el plasma (Prieto et al., 2003; Segarra et al., 2010; Ramírez et al., 2011; Villarejo et al., 2012).

Las muestras de plasma se utilizaron para la determinación enzimática de las actividades aminopeptidasas (APs), para determinar los niveles de NO, determinación cuantitativa de TG y glucosa, así como de colesterol total y HDL-colesterol.

3.2.6. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO

Posteriormente a la obtención de las muestras de sangre, las ratas se prefundieron con una solución salina al 9⁰/₀₀ a través del ventrículo izquierdo, seccionando la aurícula derecha como vía de salida (Prieto et al., 2003; Segarra et al., 2010; Ramírez et al., 2011; Villarejo et al., 2012).

Una vez prefundido el animal, se procedió a la apertura de la cavidad abdominal para la extracción de los órganos por disección, (corteza y médula renal). Las muestras se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron congeladas a -80° C hasta su utilización.

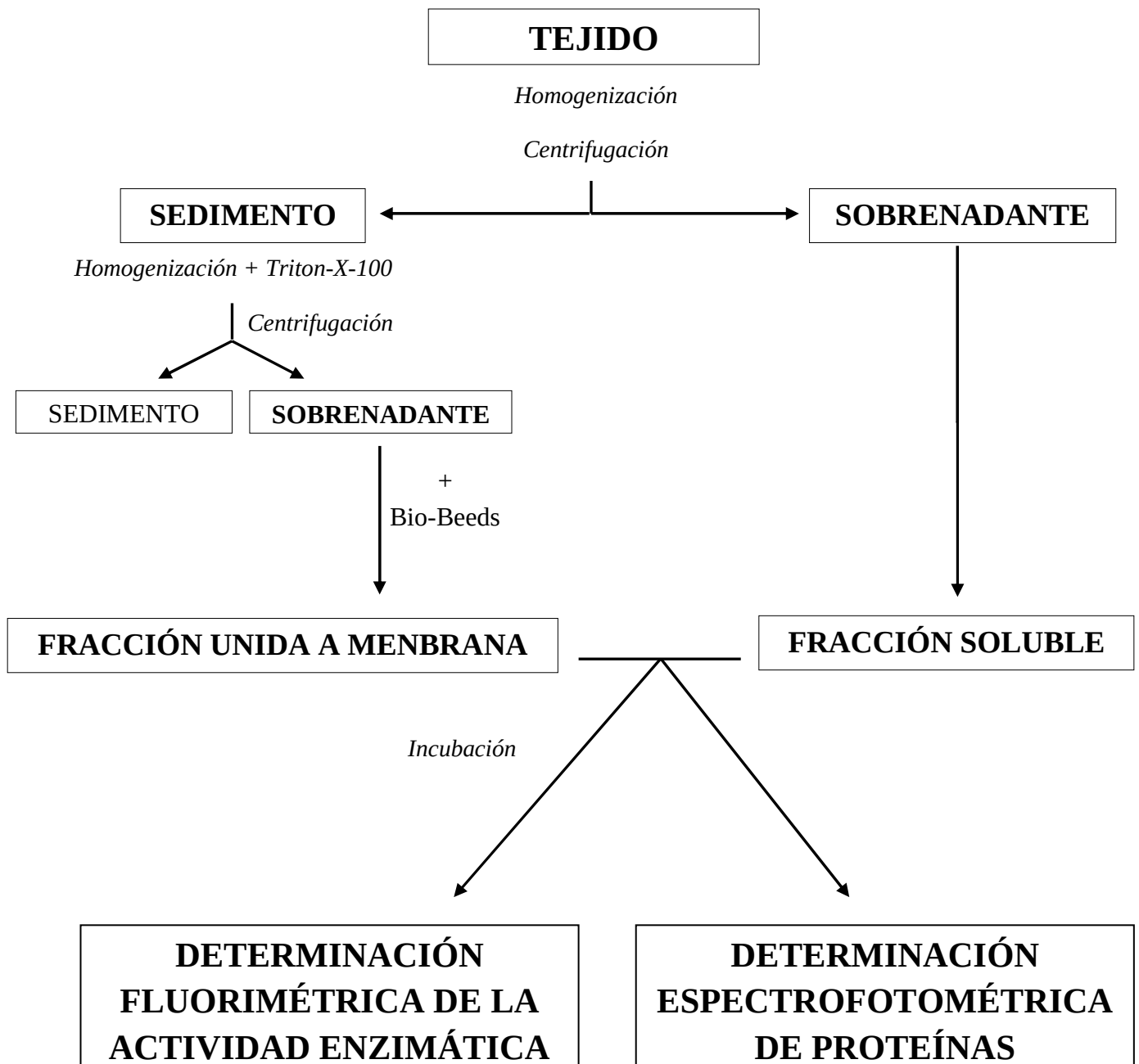
Posteriormente, se procedió a la apertura de la calota y a la extracción del cerebro que se congeló para que alcanzase la consistencia necesaria para realizar los cortes limpiamente, sin que se alterara la estructura cerebral. Por disección se tomaron muestras de hipotálamo. Las muestras de tejido cerebral fueron congeladas rápidamente y mantenidas a -80° C hasta la realización de los experimentos (Ramírez et al., 2011).

Para obtener la fracción soluble, las muestras de tejido fueron homogenizadas con 500 µl de tampón Tris-HCl 50mM con pH 7,4 y se ultracentrifugaron a 100.000 x g durante 30 min a 4° C. Los sobrenadantes resultantes se usaron para medir la actividad enzimática soluble de AlaAP, CysAP, AspAP y GluAP, y el contenido total de proteínas solubles.

Para solubilizar las proteínas de membrana, los sedimentos se rehomogenizaron en tampón Tris-HCl 50mM con pH 7,4 al que se añadió Tritón-X-100 al 1%. Posteriormente se ultracentrifugaron de nuevo a 100.000 x g durante 30 minutos a 4° C. Con el fin de retirar el detergente, a los sobrenadantes obtenidos se le añadió un adsorbente polimérico, Bio-Beads SM-2 (100mg/ml) manteniéndose en agitación por inversión en un rotor orbital como mínimo 2 horas dentro de una cámara frigorífica a 4° C. La función de este absorbente polimérico consiste en retirar el detergente y evitar la inhibición que éste provoca sobre las actividades enzimáticas (Alba et al., 1995; Ramírez et al., 2011).

Finalmente, en cada muestra se determinó la actividad enzimática unida a membrana de AlaAP, CysAP, AspAP y GluAP y el contenido de proteínas unidas a membrana.

Procesamiento de las muestras



Esquema 2. Esquema demostrativo del procedimiento seguido para la obtención de las fracciones soluble y unida a membrana, donde se determinará, mediante fluorimetría, las actividades enzimáticas Ala-AP, Cys-AP, Asp-AP y Glu-AP y, mediante espectrofotometría, el contenido de proteínas.

3.2.7. MÉTODO DE DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA.

El método se basa en la capacidad hidrolítica de las APs sobre los sustratos artificiales del tipo L-aminoacil- β -naftilamidas (arilamidas). De esta manera, el enzima reconoce el terminal amino libre de la arilamida y separa, mediante hidrólisis, la β -naftilamina del aminoácido adyacente (ver figura 13) (Ramírez et al., 2011).

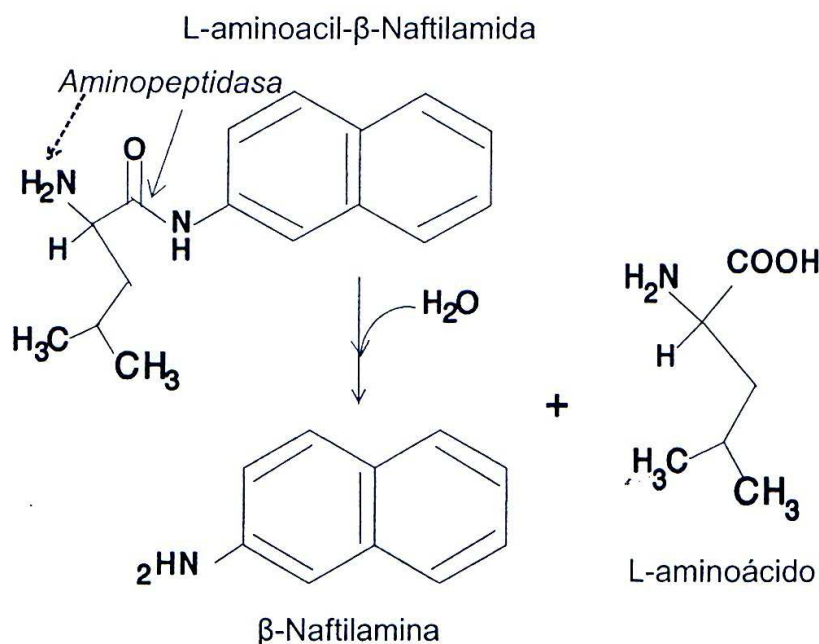


Figura 13. Reacción entre la AP y el sustrato artificial utilizado. El enzima reconoce el terminal amino libre de la aminoacil- β -naftilamida y separa, mediante hidrólisis, el aminoácido de la β -naftilamina, cuya concentración se puede medir fluorimétricamente a una determinada longitud de onda (ver texto) (Ramírez et al., 2011).

Las actividades enzimáticas solubles y unidas a membrana de AlaAP, CysAP, AspAP y GluAP, se midieron fluorimétricamente utilizando como sustratos L-Ala- β -naftilamida (L-Ala- β -Na), L-Cys- β -naftilamida (L-Cys- β -Na), L-Asp- β -naftilamida (L-Asp- β -Na) y L-Glu- β -naftilamida (L-Glu- β -Na), respectivamente, de acuerdo con el método de Greenberg (1962) para la Ala-AP, y los métodos modificados de Tobe et al. (1980) para Glu-AP y de Cheung y Cushman (1971) para Asp-AP, todos ellos modificados por Ramírez et al., en el 2011.

La sensibilidad del método permite determinaciones de actividad aminopeptidásica en el orden picomolar.

Se utilizaron placas negras de 96 pocillos en cada uno de los cuales se pipeteó 20 μ l de muestra y 90 μ l de solución sustrato (Tabla 11). Se incubaron durante 30 min las actividades enzimáticas solubles y unidas a membrana de AlaAP, CysAP, AspAP y GluAP a 37°C. A los 30 min de incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de 90 μ l de tampón acetato 0,1M (pH 4,2). La β -naftilamina liberada como resultado de la actividad enzimática se cuantificó fluorimétricamente con una longitud de onda de 412 nm de emisión y 345 nm de excitación (Ramírez et al., 2011).

Los valores de fluorescencia obtenidos fueron transformados en pmoles de β -naftilamina liberada mediante la extrapolación a una recta previamente obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de β -naftilamina en un medio igual al de la solución sustrato más 90 μ l de tampón acetato 0,1M (pH 4,2) (Ramírez et al., 2011).

La actividad soluble y unida a membrana de AlaAP, CysAP, AspAP y GluAP se expresó como pmoles de L-Ala- β -Na, L-Cys- β -Na, L-Asp- β -Na ó L-Glu- β -Na respectivamente, hidrolizados por min de incubación y por mg de proteína contenida en la muestra.

	COMPONENTES		TAMPÓN
AlaAP	L-Ala- β -Nap	2,14 mg/100ml	50 mM
	BSA	10 mg/100ml	Tampón Fosfato
	DTT	10 mg/100ml	(pH 7,4)
CysAP	L-Cys- β -Nap	5,63 mg/100ml	50 mM
	BSA	10 mg/100ml	Tampón Tris - HCl
	DTT	10 mg/100ml	(pH 6)
AspAP	L-Asp- β -Nap	2,58 mg/100ml	50 mM
	BSA	10 mg/100ml	Tampón Tris - HCl
	MnCl ₂	39,4 mg/100ml	(pH 7,4)
GluAP	L-Glu- β -Nap	2,72 mg/100ml	50 mM
	BSA	10 mg/100ml	Tampón Tris - HCl
	DTT	10 mg/100ml	(pH 7,4)
	CaCl ₂	555 mg/100ml	

Tabla 11. Composición de la soluciones sustrato utilizadas para las determinaciones enzimáticas (Ramírez et al., 2011).

3.2.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para la determinación de proteínas en las fracciones solubles o de membrana se utilizó el método de Bradford (1976), basado en la afinidad de un colorante (Coomasie azul brillante G) por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de absorción de aquel, que se puede medir espectrofotométricamente a 595nm.

Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos, y en cada pocillo se pipeteó 5µl de muestra y se le adicionó 150µl de reactivo Bradford. Los valores de absorbancia obtenidos fueron transformados en mg de proteína, mediante la extrapolación a una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) con concentraciones crecientes de proteína desde 5 a 100 microgramos en 200µl de reactivo de Bradford. Se consideró como blanco 200 µl de reactivo sin muestra (Ramírez et al., 2011).

Los procedimientos seguidos para el procesamiento de las muestras y las posteriores determinaciones de contenido en proteínas se muestran en el esquema 2.

3.2.9. DETERMINACIÓN DE LA CREATININA.

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos, y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células. La producción de creatinina depende de la modificación de la masa muscular. Varía poco y los niveles suelen ser muy estables. Se elimina través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de una patología renal.

El ensayo de la creatinina es un método colorimétrico–cinético basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé en el año 1886. Este método se aplicó en muestras de orina de aquellos animales que estuvieron bajo tratamiento farmacológico (Captopril, Propranolol, L-Name), así como en los grupos sometidos a tratamiento dietético. Para la determinación, las muestras de orina se diluyeron previamente al 1/50 con agua destilada.

La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo que se absorbe fuertemente a 492nm. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la orina. Los valores obtenidos fueron expresados en mg/dl de Creatinina en la muestra.

3.2.10. DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO.

El óxido nítrico (NO) es una molécula clave que, ya sea directamente o por medio de señalización intracelular, estimula el sistema inmunológico, mantiene la presión sanguínea en el sistema cardiovascular y modula la transmisión neuronal en el cerebro (Moncada et al., 1991). El NO es un activador de la guanilato ciclasa soluble, enzima que convierte guanosina trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclico (GMPc), lo que produce la vasodilatación, la inhibición de los leucocitos y la activación de las plaquetas (Arnold et al., 1977).

Como componente biológicamente activo del factor de relajación derivado del endotelio, el NO tiene un papel crítico en el mantenimiento de homeostasis vascular. El NO actúa como un neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico y, por tanto, es fundamental en la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos (Lloyd-Jones y Bloch., 1996), los accidentes cerebrovasculares y otras patologías.

La óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación del nitrógeno guanidina terminal del aminoácido L-arginina para producir NO y L-citrulina (Palmer et al., 1988).

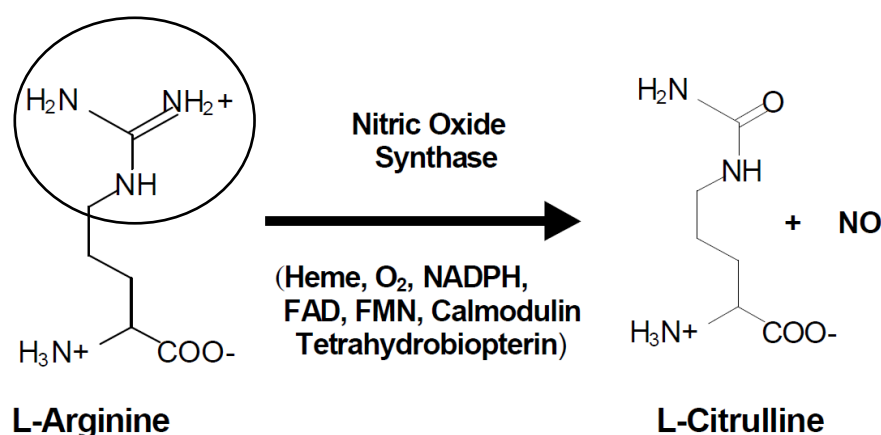
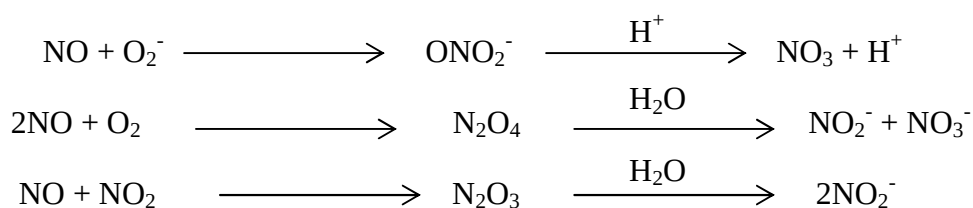


Figura 14. Síntesis del óxido nítrico generado por la óxido nítrico sintetasa, la cual cataliza la conversión de L-arginina en L-citrulina y NO (Palmer et al., 1988).

Existen tres formas distintas de la NOS: NOS neuronal, NOS endotelial y NOS inducible. NOS neuronal y NOS endotelial están reguladas por los cambios fisiológicos en la concentración intracelular de calcio, mientras que NOS inducible parece ser regulada de forma específica en cada tipo de célula.

La naturaleza efímera y volátil del NO lo hace inadecuado para la mayoría de los métodos de detección, sin embargo, dos productos de degradación estables, el nitrato (NO_3) y los nitritos (NO_2) puede ser fácilmente detectados.



Para la determinación cuantitativa del total de NO empleamos un kit proporcionado por assay designs Stressgen. Para dicha determinación empleamos como fluido biológico el plasma utilizando la técnica de Griess. El método se basa en la conversión enzimática de nitrato a nitrito por la enzima nitrato reductasa, y la posterior determinación de las concentraciones de nitritos midiendo la absorbancia a 540 nm.

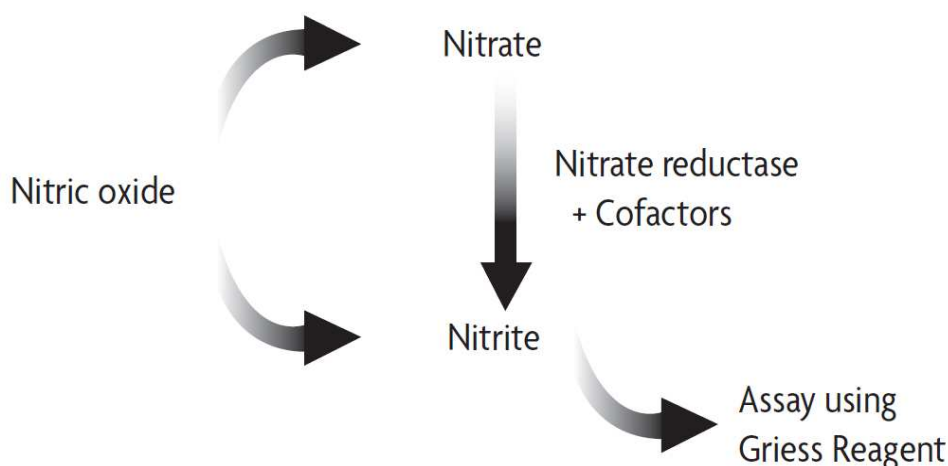


Figura 15. El NO se convierte en nitrato y nitrito en la célula. El nitrato en la muestra se convierte en nitrito en presencia de nitrato reductasa y cofactores. Las concentraciones de nitritos se determinan utilizando el reactivo de Griess.

Finalmente, la presencia de NO en el sistema se estima a partir de las concentraciones de nitritos en las muestras de plasma. Los valores de nitritos totales así obtenidos se expresan como μ moles de NO por litro de plasma.

3.2.11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE 8-ISOPROSTANOS.

Los isoprostanos son una familia de eicosanoides de origen no enzimático que se originan por la oxidación de los fosfolípidos tisulares ocasionada por la presencia de radicales libres de oxígeno.

Los isoprostanos aparecen en las muestras de tejido o plasma que han sido almacenadas durante periodos muy prolongados de tiempo o de forma inadecuada, las cuales han sido sometidas a un proceso de degradación. También aparecen en el plasma y la orina en condiciones normales, y sus niveles son considerados indicativos de estrés oxidativo.

Al menos una de estas moléculas, el 8-isoprostano (8 - iso prostaglandina $F_{2\alpha}$, ha demostrado tener actividad biológica, siendo un potente vasoconstrictor renal y pulmonar (Banerjee et al., 1992) que se ha relacionado como posible efector de la aparición del llamado síndrome tóxico hepatorenal (Vacchiano et al., 1994).

El 8-isoprostano se ha propuesto como marcador de la deficiencia en antioxidantes o de la existencia de altos niveles de estrés oxidativo (Morrow et al., 1995). Los niveles de 8-isoprostano son también considerados un indicador de la integridad de los lípidos contenidos en muestras de suero plasma, o de preparados celulares.

Para la cuantificación de los 8-isoprostanos se utilizó un ensayo competitivo mediante un Kit de EIA proporcionado por Cayman Biotechnology.

Este ensayo se basa en la competencia entre los 8-isoprostanos y la 8-isoprostano acetilcolintransferasa conjugada (AChE) por un número limitado de sitios de unión a anticuerpos específicos de conejo. Ya que la concentración de 8-isoprostano es variable mientras que la de AChE se mantiene prácticamente estable, la cantidad de esta última que es capaz de unirse a los anticuerpos será inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostanos en cada una de las muestras.

Una vez ha tenido lugar la unión a los anticuerpos, la placa fue lavada para eliminar los restos de reactivos que no se hubiesen unido al pocillo, y se añadió el

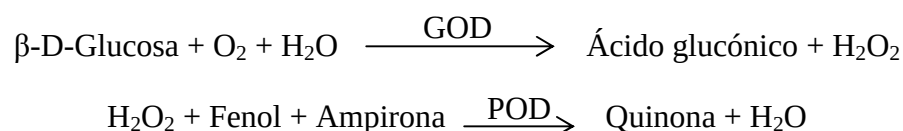
reactivo de Ellman, que contiene el sustrato para la AChE. El producto de la reacción enzimática consecuente tiene un marcado color amarillo que puede cuantificarse a una longitud de onda de 412 nm. La intensidad de este color, determinado por espectrofotometría, es proporcional a la cantidad de AChE unido al anticuerpo, la cual es a su vez inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano libre presente en el pocillo durante la incubación.

Los resultados obtenidos durante la determinación de los niveles de estrés oxidativo fueron expresados en ng de isoprostanos/mg de creatinina.

3.2.12. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS EN PLASMA SANGUÍNEO

a) Determinación de Glucosa en plasma.

Se determinó de forma cuantitativa la concentración de glucosa en plasma mediante el método GOD-POD, con un kit procedente de Spinreact. La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona, en presencia de peroxidasa (POD). La secuencia de reacciones se muestra en el siguiente esquema:



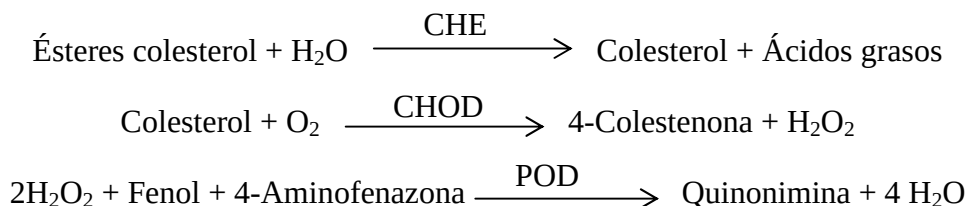
La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en el plasma, y puede ser determinada utilizando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 505 nm.

b) Determinación del Colesterol Total en plasma.

El colesterol es una sustancia lipídica presente en todas las células del organismo. El hígado produce gran parte del colesterol que necesita el organismo para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del

colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular.

El colesterol total (CT) se determinó de forma cuantitativa en plasma, mediante el método GOD-POD, con un kit procedente de Spinreact. El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

Los valores obtenidos fueron expresados en mg/dl de colesterol total en la muestra.

c) Determinación del Colesterol HDL en plasma.

El colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a menudo se denomina “colesterol bueno”, ya que niveles elevados están relacionados con un menor riesgo cardiovascular. Un nivel bajo de colesterol HDL es considerado uno de los principales factores de riesgo cardiovascular.

Se determinó el colesterol de las distintas fracciones lipoprotéicas en plasma, HDL y LDL, por separado. Para ello, se procedió antes a su separación por precipitación con ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio. Con este método precipitan las lipoproteínas que contienen apoB (quilomicrones, VLDL, LDL y Lpa) quedando tras su centrifugación, el sobrenadante claro conteniendo las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Dicho sobrenadante se emplea para determinar el colesterol HDL utilizando el método enzimático GOD-POD mediante un kit procedente de Spinreact. Por último, se procedió a calcular el colesterol-LDL mediante la fórmula de Friedewald:

$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5} - \text{HDL colesterol}$$

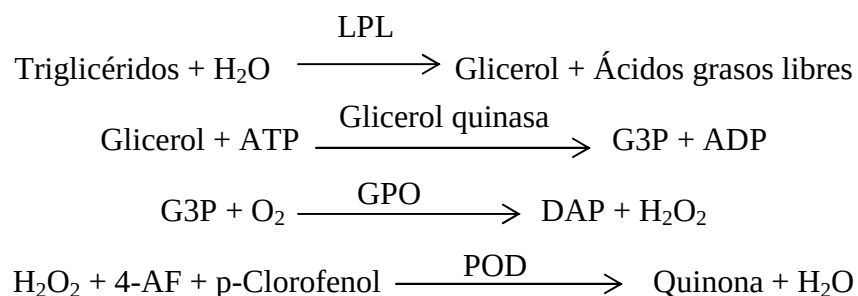
Los valores obtenidos fueron expresados en mg/dl de HDLc en la muestra.

d) Determinación de los triglicéridos en plasma.

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula o son utilizados como forma química de almacenamiento energético. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre.

Los triglicéridos incubados con el enzima lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de GK para producir glicerol-3-fosfato (G₃P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G₃P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO.

Al final, el H₂O₂ reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



Los triglicéridos del plasma se determinaron de forma cuantitativa por el método GPO-POD, mediante un kit procedente de *Spinreact*. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en el plasma.

Los valores obtenidos fueron expresados en mg/dl de triglicéridos en la muestra.

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizaron varios procedimientos. Por una parte, con los resultados obtenidos de los animales con tratamiento farmacológico se realizó un estudio descriptivo donde se calculó la media y el error típico de la media para los niveles de ingesta de alimento, agua y diuresis, además de para las distintas actividades aminopeptidasas evaluadas. También se llevo a cabo el estudio descriptivo en los demás parámetros analizados, como el NO en orina y plasma, niveles de glucosa, CT, LDL, HDL y TG en plasma.

Para comparaciones posteriores entre las medias de los cuatro grupos de los animales con tratamiento farmacológico, se utilizó el procedimiento ANOVA de un factor o de una vía que genera un análisis de varianza de un factor para una variable dependiente cuantitativa respecto a una única variable de factor, y se utiliza para contrastar la hipótesis de que varias medias son iguales (esta técnica es una extensión de la prueba t para dos muestras). Además de determinar que existen diferencias entre las medias, también podemos saber qué medias difieren, y para ello llevamos a cabo los contrastes “post hoc”, los cuales se realizan después de haber llevado a cabo el experimento. La prueba de la diferencia honestamente significativa que empleamos es HSD de Tukey. Este test se utiliza cuando se quiere comparar cada grupo con todos los demás, este procedimiento fue empleado para comparar el grupo control con el grupo captopril y el grupo propranolol, mientras que se empleo la prueba de la t de Student para la comparación entre el grupo control y el grupo L-NAME. En ambos casos los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$) y aquellos valores de p superiores a 0,05 se consideraron estadísticamente no significativos.

Para los grupos de los animales que estuvieron sometidos a diferentes tratamientos dietéticos se realizó un estudio descriptivo donde se calculó la media y el error típico de la media para los valores de ingesta de alimento, agua y diuresis y para las distintas actividades aminopeptidasas. También se llevo a cabo el estudio descriptivo para los valores de los demás parámetros analizados, como el NO en orina y plasma, los niveles de glucosa, CT, LDL, HDL y TG en plasma.

Para comparaciones posteriores entre medias de los dos grupos de los animales que estuvieron alimentados con diferentes dietas, se realizo un estudio de la varianza

ANOVA de un factor o de una vía y se utilizó el procedimiento de la prueba de la t de Student, para la determinación de las diferencias entre dos medias muestrales, muestras independientes, empleando un intervalo de confianza al 95%.

Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos, (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) y aquellos valores de p superiores a 0,05 se consideraron estadísticamente no significativos.

En ambos casos, se utilizó el paquete estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15.0).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO METABÓLICO Y FISIOLÓGICO

4.1.1. EFECTO DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL

Evolución de los valores de Presión Arterial Sistólica

En la Tabla 13 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de presión arterial sistólica (PAS) expresados en mmHg, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Captopril en comparación con los de los grupos Control y Propranolol a los 15 días del inicio del tratamiento farmacológico y al final del periodo experimental. No encontramos diferencias entre los grupos Control y Propranolol.

	PAS Inicial	PAS 15 días	PAS Final
MEDIA ± EE			
Control	165,3 ± 2,35	192,5 ± 4,08	206,8 ± 6,83
Captopril	151,6 ± 5,22	163,6 ± 4,72	159,4 ± 5,28
Propranolol	166,0 ± 4,70	200,3 ± 5,00	206,8 ± 3,89
P-Valor			
C-CA	<i>n.s.</i>	**	***
C-P	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
CA-P	<i>n.s.</i>	***	***

Tabla 13. Media ± el error estándar (EE) de los valores de presión arterial sistólica (PAS) (expresados en mmHg) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental. ** p< 0,01; ***p<0,001.

Evolución del peso corporal e ingesta de alimento

En la Tabla 14 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de peso corporal total expresados en gramos, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Propranolol, en comparación con los de los grupos Control y Captopril, a los 15 días del inicio del tratamiento farmacológico y al final del periodo experimental.

	Peso Inicial	Peso 15 días	Peso Final
MEDIA ± EE			
Control	265,9 ± 4,13	299,9 ± 5,30	316,8 ± 4,23
Captopril	271,9 ± 5,06	314,3 ± 6,27	327,1 ± 5,29
Propranolol	268,8 ± 4,87	239,3 ± 6,22	264,1 ± 5,67
P-Valor			
C-CA	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
C-P	<i>n.s.</i>	***	***
CA-P	<i>n.s.</i>	***	***

Tabla 14. Media ± el error estándar (EE) de los valores de peso corporal total (expresados en gramos) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental. ***p<0,001.

En la Tabla 15 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de incremento de peso total, expresados en gramos, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Propranolol en comparación con los de los grupos Control y Captopril.

Incremento de Peso	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	50,9 ± 1,88	55,4 ± 3,18	-4,7 ± 7,17
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	<i>n.s.</i>	***	***

Tabla 15. Media ± el error estándar (EE) del incremento total de peso corporal (expresado en gramos) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) durante todo el periodo experimental. ***p<0,001.

En la Tabla 16 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento, expresados en gr/100 g. PV día, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Ingesta de Alimento	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	6 ± 0,67	5,9 ± 0,55	4,2 ± 0,39
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 16. Media ± el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento (expresado en gramos/100g PV/día) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental.

En la Tabla 17 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de peso del corazón, ventrículo izquierdo y riñón, expresados en g./100g. de PV, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Para el peso del corazón completo, se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Propranolol en comparación con los de los grupos Control y Captopril. Para el ventrículo izquierdo, se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Captopril en comparación con los de los grupos Control y Propranolol, y estadísticamente superior para el grupo Propranolol en comparación con el del grupo Control. El peso medio del riñón fue estadísticamente superior para el grupo Propranolol en comparación con el de los grupos Control y Captopril.

	Peso corazón	Peso ventrículo	Peso riñón
MEDIA ± EE			
Control	0,38 ± 0,009	0,29 ± 0,006	0,32 ± 0,006
Captopril	0,34 ± 0,013	0,26 ± 0,007	0,32 ± 0,007
Propranolol	0,40 ± 0,006	0,33 ± 0,007	0,37 ± 0,007
P-Valor			
C-CA	*	**	n.s.
C-P	n.s.	**	***
CA-P	**	***	***

Tabla 17. Media ± el error estándar (EE) de los valores de peso (expresado en gramos/100gr PV/) de corazón, ventrículo izquierdo y riñón, de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Ingesta de bebida, diuresis y balance hídrico

En la Tabla 18 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida, expresados en ml/100 g. PV/día, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. La ingesta media de bebida fue estadísticamente superior en el grupo Captopril en comparación con la del grupo Propranolol.

Ingesta de Bebida	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	11,2 ± 0,59	11,5 ± 1,71	6,5 ± 1,08
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	n.s.	*	n.s.

Tabla 18. Media ± el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental. *p<0,05.

En la Tabla 19 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de diuresis, expresados en ml/100 g PV/día, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. La diuresis media fue estadísticamente superior en el grupo Captopril en comparación con la del grupo Propranolol.

Diuresis	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	2,8 ± 0,29	4,6 ± 0,69	1,5 ± 0,22
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	n.s.	*	n.s.

Tabla 19. Media ± el error estándar (EE) de los valores de diuresis (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental. *p<0,05.

En la Tabla 20 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico, expresados en ml/100g. de PV/día, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Balance Hídrico	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	8,7 ± 0,71	6,8 ± 1,15	1,5 ± 0,22
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 20. Media ± el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental.

Parámetros sanguíneos: valores de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracciones de colesterol en plasma.

En la Tabla 21 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en plasma de óxido nítrico, expresados en µmol/l, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Óxido Nítrico	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	12,0 ± 2,33	12,8 ± 2,89	10,6 ± 3,18
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 21. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de óxido nítrico en plasma (expresados en $\mu\text{mol/l}$) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental.

En la Tabla 22 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración de glucosa en plasma, expresados en mg./dl, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos.

Glucosa	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	121,3 ± 12,54	146,5 ± 6,40	105,8 ± 15,92
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 22. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de glucosa en plasma (expresados en mg/dL) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental.

En la Tabla 23 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en plasma de colesterol total, triglicéridos, y fracciones de colesterol HDL y LDL, expresados en mg./dl, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. El valor medio de concentración plasmática de triglicéridos fue estadísticamente superior para el grupo Propranolol en comparación con el del grupo Control.

	CHO-T	TGL	HDL	LDL
MEDIA ± EE				
Control	82,2 ± 11,46	46 ± 1,76	53,4 ± 2,39	46 ± 9,38
Captopril	71,8 ± 10,08	47,9 ± 1,68	34,6 ± 5,03	27,6 ± 9,21
Propranolol	96,1 ± 11,85	53,4 ± 2,39	35,7 ± 6,30	49,7 ± 11,83
P-Valor				
C-CA	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
C-P	<i>n.s.</i>	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
CA-P	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 23. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de colesterol total (CHO-T), triglicéridos totales (TGL), fracción HDL de colesterol y fracción LDL de colesterol en plasma, (expresados en mg/dl) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental. * $p < 0,05$.

Niveles de estrés oxidativo

En la Tabla 24 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración de isoprostanos en orina, expresados en ng./mg. de creatinina, obtenidos para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. La concentración media de isoprostanos en orina fue estadísticamente superior en el grupo Captopril en comparación con la del grupo Control.

Isoprostanos	Control	Captopril	Propranolol
MEDIA ± EE	21,6 ± 1,60	28,5 ± 3,50	12,7 ± 1,27
	C-CA	CA-P	C-P
P-Valor	*	n.s.	n.s.

Tabla 24. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de isoprostanos en orina (expresados en ng/mg creatinina) de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P) al final del periodo experimental. * p<0,05.

4.1.2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA: L-NAME.

Evolución de los valores de Presión Arterial Sistólica

En la Tabla 25 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de presión arterial sistólica (PAS) expresados en mmHg, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos que se partió de un valor medio estadísticamente inferior para el grupo L-NAME en comparación con el del grupo Control al inicio del periodo experimental; a pesar de lo cuál, a los 15 días del inicio del tratamiento farmacológico y al final del periodo experimental el valor medio del grupo L-NAME fue claramente superior al del grupo Control.

	PAS Inicial	PAS 15 días	PAS Final
MEDIA ± EE			
Control	165,3 ± 2,35	192,5 ± 4,08	206,8 ± 6,83
L-NAME	151,9 ± 4,65	230,7 ± 3,25	234,8 ± 4,11
P-Valor			
C-L-NAME	*	***	*

Tabla 25. Media ± el error estándar (EE) de los valores de presión arterial sistólica (PAS) (expresados en mmHg) de los grupos Control (C) y L-NAME al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental. *p<0,05; ***p<0,001.

Evolución del peso corporal e ingesta de alimento

En la Tabla 26 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de peso corporal total expresados en gramos, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que a partir de los 15 días de administración del fármaco el valor medio de grupo L-NAME fue inferior al del grupo Control.

	Peso Inicial	Peso 15 días	Peso Final
MEDIA ± EE			
Control	265,9 ± 4,13	299,9 ± 5,30	316,8 ± 4,23
L-NAME	266,3 ± 6,70	285,2 ± 9,93	289,7 ± 15,75
P-Valor			
C-L-NAME	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 26. Media ± el error estándar (EE) de los valores de peso corporal total (expresados en gramos) de los grupos Control (C) y L-NAME al inicio, a los 15 días y al final del periodo experimental.

En la Tabla 27 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de incremento de peso total, expresados en gramos, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. Observamos que no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa debido a la gran dispersión de los datos en el grupo L-NAME.

Incremento de Peso	Control	L-NAME
MEDIA ± EE	50,9 ± 1,88	19,2 ± 12,90
P-Valor	C-L-NAME <i>n.s.</i>	

Tabla 27. Media ± el error estándar (EE) del incremento total de peso corporal (expresado en gramos) de los grupos Control (C) y L-NAME durante todo el periodo experimental.

En la Tabla 28 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento, expresados en gr/día, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa.

Ingesta de Alimento	Control	L-NAME
MEDIA $\pm$ EE	6 $\pm$ 0,67	4,9 $\pm$ 0,70
<i>P-Valor</i>	<i>C-L-NAME</i> <i>n.s.</i>	

Tabla 28. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento (expresado en gramos/100gr PV/día) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental.

En la Tabla 29 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de peso del corazón, ventrículo izquierdo y riñón, expresados en g./100g. de PV, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Tanto para el peso del corazón completo, como para el del ventrículo izquierdo y el riñón, se obtuvieron valores medios estadísticamente superiores para el grupo L-NAME en comparación con los del grupo Control.

	Peso corazón	Peso ventrículo	Peso riñón
MEDIA $\pm$ EE			
Control	0,38 $\pm$ 0,009	0,29 $\pm$ 0,006	0,32 $\pm$ 0,006
L-NAME	0,49 $\pm$ 0,031	0,39 $\pm$ 0,018	0,35 $\pm$ 0,010
<i>P-Valor</i>			
<i>C-L-NAME</i>	**	**	*

Tabla 29. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de peso (expresado en gramos/100gr PV/) de corazón, ventrículo izquierdo y riñón, de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental.*p<0,05; **p<0,01.

Ingesta de bebida, diuresis y balance hídrico

En la Tabla 30 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida, expresados en ml/100 g. PV/día, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en las comparaciones entre los dos grupos. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

Ingesta de Bebida	Control	L-NAME
MEDIA $\pm$ EE	11,2 $\pm$ 0,59	11,7 $\pm$ 0,56
<i>P-Valor</i>	<i>C-L-NAME</i> <i>n.s.</i>	

Tabla 30. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental.

En la Tabla 31 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de diuresis, expresados en ml/100 g PV/día, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparaciones entre los dos grupos. La diuresis media fue estadísticamente superior en el grupo L-NAME en comparación con la del grupo Control.

Diuresis	Control	L-NAME
MEDIA ± EE	2,8 ± 0,29	7,4 ± 1,31
P-Valor	C-L-NAME *	

Tabla 31. Media ± el error estándar (EE) de los valores de diuresis (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental. *p<0,05.

En la Tabla 32 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico, expresados en ml/100g. de PV/día, obtenidos para los grupos Control y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. El valor medio para el Balance Hídrico fue estadísticamente inferior para el grupo L-NAME en comparación con el del grupo Control.

Balance Hídrico	Control	L-NAME
MEDIA ± EE	8,7 ± 0,71	4,3 ± 1,11
P-Valor	C-L-NAME *	

Tabla 32. Media ± el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental. *p<0,05.

Parámetros sanguíneos: valores de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracciones de colesterol en plasma

En la Tabla 33 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en plasma de óxido nítrico, expresados en µmol/l, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. El valor medio de concentración de óxido nítrico en plasma fue estadísticamente inferior en el grupo L-NAME en comparación con el del grupo Control.

Óxido Nítrico	Control	L-NAME
MEDIA ± EE	12,0 ± 2,33	6,2 ± 0,89
P-Valor	C-L-NAME *	

Tabla 33. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de óxido nítrico en plasma (expresados en $\mu\text{mol/l}$) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental. * $p < 0,05$.

En la Tabla 34 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración de glucosa en plasma, expresados en mg./dl, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

Glucosa	Control	L-NAME
MEDIA ± EE	121,3 ± 12,54	170,1 ± 28,22
P-Valor	C-L-NAME n.s.	

Tabla 34. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de glucosa en plasma (expresados en mg/dl) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental.

En la Tabla 35 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en plasma de colesterol total, triglicéridos, y fracciones de colesterol HDL y LDL, expresados en mg./dl, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. El valor medio de concentración plasmática de triglicéridos fue estadísticamente superior para el grupo L-NAME en comparación con el del grupo Control.

	CHO-T	TGL	HDL	LDL
MEDIA ± EE				
Control	82,2 ± 11,46	46 ± 1,76	53,4 ± 2,39	46 ± 9,38
L-NAME	105 ± 9	65,3 ± 5,21	33,2 ± 5,84	58,8 ± 10,3
P-Valor				
C-L-NAME	n.s.	**	n.s.	n.s.

Tabla 35. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de colesterol total (CHO-T), triglicéridos totales (TGL), fracción HDL de colesterol y fracción LDL de colesterol en plasma, (expresados en mg/dl) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental. ** $p < 0,01$.

Niveles de estrés oxidativo

En la Tabla 36 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración de isoprostanos en orina, expresados en ng./mg. de creatinina, obtenidos para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. La concentración media de isoprostanos en orina fue estadísticamente superior en el grupo L-NAME en comparación con la del grupo Control.

Isoprostanos	Control	L-NAME
MEDIA ± EE	21,6 ± 1,60	40,3 ± 6,60
P-Valor	C-L-NAME *	

Tabla 36. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de isoprostanos en orina (expresados en ng/mg creatinina) de los grupos Control (C) y L-NAME al final del periodo experimental. *p<0,05.

4.1.3. EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA SUPLEMENTADA CON ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

Evolución de los valores de Presión Arterial Sistólica

En la Tabla 37 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de presión arterial sistólica (PAS) expresados en mmHg, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) determinados a lo largo de todo el periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos que, con excepción de la semana 1, a lo largo de todo el periodo experimental los valores medios fueron estadísticamente inferiores para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con los del grupo Control.

PAS	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10	Sem12
MEDIA ± EE									
Estándar	108,9 ±3,93	128,5 ±1,74	140,9 ±1,88	153,5 ±4,58	163,1 ±5,15	178,1 ±7,04	189 ±8,72	203,6 ±8,49	213,8 ±6,99
Aceite de Oliva Virgen Extra	122,8 ±2,40	117,6 ±4,80	125,6 ±4,32	122,8 ±4,64	124,5 ±4,39	132,9 ±3,73	145,8 ±2,93	157,3 ±4,00	170,6 ±4,72
P-Valor									
E-AOVE	**	n.s.	**	***	***	***	**	**	***

Tabla 37. Media ± el error estándar (EE) de los valores de presión arterial sistólica (PAS) (expresados en mmHg) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE), a lo largo de todo el periodo experimental. **p<0,01; ***p<0,001.

Evolución del peso corporal e ingesta de alimento

En la Tabla 38 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de peso corporal total expresados en gramos, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) (n=8) durante todo el periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Peso	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10	Sem12
MEDIA ± EE									
Estándar	93,6 ±6,17	141,3 ±8,39	171,9 ±8,52	212,9 ±8,51	236 ±8,96	274,9 ±10,20	302,6 ±8,87	322,6 ±8,15	329,3 ±8,64
Aceite de Oliva Virgen Extra	106,1 ±3,03	132,9 ±3,08	179 ±3,49	214,3 ±3,24	242,9 ±2,87	287,5 ±2,83	302,9 ±2,96	330,5 ±4,16	349,4 ±3,64
P-Valor									
E-AOVE	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 38. Media ± el error estándar (EE) de los valores de peso corporal total (expresados en gramos) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) a lo largo de todo el periodo experimental.

En la Tabla 39 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de incremento de peso total, expresados en gramos, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

Incremento de Peso	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	235,6 ± 7,42	243,3 ± 4,86
	E-AOVE	
P-Valor	<i>n.s.</i>	

Tabla 39. Media ± el error estándar (EE) del incremento total de peso corporal (expresado en gramos) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) durante todo el periodo experimental.

En la Tabla 40 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento, expresados en g./día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo de todo el periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. En la semana 0, al inicio del periodo experimental, el valor medio de ingesta del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue estadísticamente mayor que el del grupo Estándar. En las semanas 1, 4

y 8 los valores medios de ingesta del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fueron estadísticamente inferiores a los del grupo Estándar.

Ingesta	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10	Sem12
MEDIA ± EE									
Estándar	18,8 ±0,62	22,1 ±0,64	20,6 ±0,82	22,3 ±0,78	22 ±0,63	19,3 ±0,98	20,8 ±0,92	19,1 ±0,79	19,3 ±0,65
Aceite de Oliva Virgen Extra	22,4 ±0,65	18,7 ±0,34	22,5 ±0,71	20,3 ±1,00	19,8 ±0,60	19 ±0,85	17,9 ±0,89	20,6 ±0,58	21 ±0,67
P-Valor									
E-AOVE	**	***	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.

Tabla 40. Media ± el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento (expresado en gramos/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) a lo largo de todo el periodo experimental. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

En la Tabla 41 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento, expresados en g./100 g. PV/ día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en las comparación entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Ingesta de Alimento	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	5,9 ± 0,25	6 ± 0,19
P-Valor	E-AOVE n.s.	

Tabla 41. Media ± el error estándar (EE) de los valores de ingesta de alimento (expresado en gramos/100g PV/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental.

En la Tabla 42 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de peso del corazón, ventrículo izquierdo y riñón, expresados en g./100g. de PV, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Tan sólo para el peso del riñón se obtuvo diferencia estadísticamente significativa, siendo el valor medio del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra inferior al del grupo Estándar.

	Peso corazón	Peso ventrículo	Peso riñón
MEDIA ± EE			
Estándar	0,38 ± 0,006	0,29 ± 0,007	0,35 ± 0,012
Aceite de Oliva Virgen Extra	0,38 ± 0,009	0,30 ± 0,005	0,31 ± 0,009
P-Valor			
E-AOVE	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	*

Tabla 42. Media ± el error estándar (EE) de los valores de peso (expresado en gramos/100gr PV/) de corazón, ventrículo izquierdo y riñón, de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. *p<0,05.

Ingesta de bebida, diuresis y balance hídrico

En la Tabla 43 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida, expresados en ml/día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. La ingesta media de bebida fue estadísticamente inferior en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con la del grupo Estándar en las semanas 0, 1, 2 y al final del periodo experimental (semana 12).

Bebida	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10	Sem12
MEDIA ± EE									
Estándar	22,1 ±0,55	25,3 ±0,53	22,1 ±1,27	22 ±1,24	21,5 ±1,09	20,8 ±1,42	19,4 ±0,96	20,8 ±1,10	19,9 ±0,61
Aceite de Oliva Virgen Extra	14,3 ±0,78	15,8 ±0,37	18,1 ±0,64	22,3 ±0,75	18,9 ±0,46	22,9 ±0,93	21,2 ±0,72	21,3 ±0,99	16,4 ±1,12
P-Valor									
E-AOVE	***	**	*	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	*

Tabla 43. Media ± el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida (expresados en ml/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) a lo largo de todo el periodo experimental. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

En la Tabla 44 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida, expresados en ml/100 g PV/día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en las comparación entre los dos grupos. La ingesta de bebida media fue estadísticamente inferior en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con la del grupo Estándar.

Ingesta Bebida	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	6,1 ± 0,19	4,7 ± 0,30
P-Valor	E-AOVE **	

Tabla 44. Media ± el error estándar (EE) de los valores de ingesta de bebida (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. **p<0,01.

En la Tabla 45 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de diuresis, expresados en ml/día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. La diuresis media fue estadísticamente inferior en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con la del grupo Estándar en las semanas 0, 3, 4, 6 y 8; y estadísticamente superior en la semana 2.

Diuresis	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10	Sem12
MEDIA ± EE									
Estándar	6,5 ±0,5	6,8 ±0,41	5,4 ±0,53	11,5 ±0,98	8,3 ±0,90	9,8 ±0,98	9,4 ±0,78	9,3 ±0,53	9 ±0,42
Aceite de Oliva Virgen Extra	4,1 ±0,48	5,7 ±0,39	7,5 ±0,76	5,5 ±0,42	5,5 ±0,40	6,1 ±0,52	5,6 ±0,29	7,6 ±1,02	9 ±1,24
P-Valor									
E-AOVE	**	n.s.	*	***	*	**	**	n.s.	n.s.

Tabla 45. Media ± el error estándar (EE) de los valores de diuresis (expresados en ml/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen (AOV) a lo largo de todo el periodo experimental. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

En la Tabla 46 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de diuresis, expresados en ml/100 g PV/día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Diuresis	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	2,7 ± 0,13	2,6 ± 0,34
P-Valor	E-AOVE n.s.	

Tabla 46. Media ± el error estándar (EE) de los valores de diuresis (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental.

En la Tabla 47 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico, expresados en ml/100g. de PV/día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo de todo el periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Los valores medios para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fueron estadísticamente inferiores en las semanas 0, 1, 2, y al final del periodo experimental (semana 12); y estadísticamente superiores en las semanas 3, 6 y 8.

B. Hídrico	Sem 0	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Sem 6	Sem 8	Sem 10	Sem12
MEDIA ± EE									
Estándar	15,6 ±0,53	18,5 ±0,42	16,8 ±1,66	10,5 ±1,79	13,3 ±1,35	11 ±1,36	10 ±1,32	11,5 ±1,12	10,88 ±0,79
Aceite de Oliva Virgen Extra	10,2 ±0,50	10,2 ±0,53	10,6 ±0,56	16,8 ±0,88	13,4 ±0,39	16,8 ±0,86	15,7 ±0,62	13,7 ±0,95	7,43 ±0,33
P-Valor									
E-AOVE	***	***	**	*	n.s.	**	**	n.s.	**

Tabla 47. Media ± el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico (expresados en ml/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) a lo largo de todo el periodo experimental. *p<0,05; **p<0,01;***p<0,001.

En la Tabla 48 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico, expresados en ml/100 g PV/día, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. El valor medio correspondiente al grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue estadísticamente inferior al del grupo Estándar.

Balance Hídrico	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	3,3 ± 0,24	2,1 ± 0,09
P-Valor	E-AOVE **	

Tabla 48. Media ± el error estándar (EE) de los valores de Balance Hídrico (expresados en ml/100gr PV/día) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. **p<0,01.

Parámetros sanguíneos: valores de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracciones de colesterol en plasma

En la Tabla 49 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en plasma de óxido nítrico, expresados en µmol/l, obtenidos para los

grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en la comparación entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Óxido Nítrico	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	11,1 ± 0,84	12,8 ± 1,71
P-Valor	<i>E-AOVE</i> <i>n.s.</i>	

Tabla 49. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de óxido nítrico en plasma (expresados en $\mu\text{mol/l}$) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental.

En la Tabla 50 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en orina de óxido nítrico, expresados en $\mu\text{mol/l}$, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Sólo en la semana 6 se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, siendo el valor medio del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra menor que el del grupo Estándar.

B. Hídrico	Sem 0	Sem 6	Sem12
MEDIA ± EE			
Estándar	21,1 ± 2,26	55,9 ± 6,55	69,4 ± 16,40
Aceite de Oliva Virgen Extra	24,5 ± 5,78	35,4 ± 6,19	48,8 ± 10,84
P-Valor			
<i>E-AOVE</i>	<i>n.s.</i>	*	<i>n.s.</i>

Tabla 50. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de óxido nítrico en orina (expresados en $\mu\text{mol/l}$) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) a lo largo del periodo experimental. * $p < 0,05$.

En la Tabla 51 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores en ayunas de concentración de glucosa en plasma, expresados en mg./dl , obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en la comparación entre los dos grupos. El valor medio del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue estadísticamente superior al del grupo Estándar.

Glucosa	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	132,9 ± 5,16	186,2 ± 16,25
P-Valor	<i>E-AOVE</i> **	

Tabla 51. Media ± el error estándar (EE) de los valores en ayunas de concentración de glucosa en plasma (expresados en mg/dl) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. **p<0,01.

En la Tabla 52 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de glucemia en sangre, expresados en mg./dl, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) en condiciones basales (ayunas) y tras la inyección de una sobrecarga intraperitoneal de glucosa(15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. después de la inyección); así como los valores de P obtenidos en la comparación entre los dos grupos. Observamos que en condiciones basales no aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, pero que en las siguientes determinaciones el valor medio del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue siempre estadísticamente superior al del grupo Estándar, manteniéndose la diferencia incluso 120 min. después de la administración de la glucosa.

B. Hídrico	Basal	15 min.	30 min.	45 min.	60min.	90min.	120 min.
MEDIA ± EE							
Estándar	63 ±3,19	137,9 ±6,65	97,1 ±5,03	88 ±3,26	78,9 ±1,66	67 ±3,16	60,8 ±2,30
Aceite de Oliva Virgen Extra	64,9 ±2,7	229 ±28,41	176,6 ±15,47	152,1 ±7,33	126,1 ±2,74	106 ±2,97	74,3 ±4,72
P-Valor							
<i>E-AOVE</i>	<i>n.s.</i>	*	**	***	***	***	*

Tabla 52. Media ± el error estándar (EE) de los valores en de glucemia en sangre (expresados en mg/dl) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) tras la inyección intraperitoneal de una sobrecarga de glucosa. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

En la Tabla 53 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de área bajo la curva (AUC) correspondientes a las curvas de tolerancia a la glucosa realizadas a los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en la comparación entre los dos grupos. El valor medio del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue estadísticamente superior al del grupo Estándar.

AUC	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	10013,6 ± 248,05	15929,3 ± 856,28
P-Valor	<i>E-AOVE</i> ***	

Tabla 53. Media ± el error estándar (EE) de los valores de área bajo la curva (AUC) correspondientes a las curvas de tolerancia a la glucosa realizadas a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. ***p<0,001.

En la Tabla 54 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración en plasma de colesterol total, triglicéridos, fracciones de colesterol HDL y LDL y relación HDL/ colesterol total, expresados en mg./dl, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. El valor medio de concentración plasmática de colesterol total, triglicéridos, y colesterol LDL fue estadísticamente superior para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con el del grupo Control.

	CHO-T	TGL	HDL	HDL/CHOT	LDL
MEDIA ± EE					
Estándar	81,9 ± 5,04	39,3 ± 14,6	23,3 ± 1,57	0,3 ± 0,03	50,8 ± 6,08
Aceite de Oliva Virgen Extra	144,0 ± 14,04	134,4 ± 18,77	28,8 ± 5,85	0,2 ± 0,04	88,3 ± 10,58
P-Valor					
<i>E-AOVE</i>	**	**	n.s.	n.s.	**

Tabla 54. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de colesterol total (CHO-T), triglicéridos totales (TGL), fracción HDL de colesterol, relación HDL/colesterol total (HDL/CHOT) y fracción LDL de colesterol en plasma, (expresados en mg/dl) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. **p<0,01.

Niveles de estrés oxidativo

En la Tabla 55 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de concentración de isoprostamos en orina, expresados en ng./mg. de creatinina, obtenidos para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como el valor de P obtenido en las comparación entre los dos grupos. La concentración media de isoprostanos en orina fue estadísticamente superior en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con la del grupo Estándar.

Isoprostanos	Estándar	Aceite de Oliva Virgen Extra
MEDIA ± EE	15,0 ± 1,01	7,5 ± 0,72
<i>P-Valor</i>	<i>E-AOVE</i> ***	

Tabla 55. Media ± el error estándar (EE) de los valores de concentración de isoprostanos en orina (expresados en ng/mg creatinina) de los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) al final del periodo experimental. ***p<0,001.

4.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS.

4.2.1. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO.

En la Tabla 56 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/ml muestra/min, en el plasma de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que para la actividad Glutámico Aminopeptidasa se obtuvo un valor medio estadísticamente superior para el grupo Propranolol en comparación con el del grupo Control.

	ALA-AP	CYS-AP	GLU-AP	ASP-AP
MEDIA $\pm$ EE				
Control	18712,3 $\pm$ 1260,38	3531,4 $\pm$ 196,29	5557,1 $\pm$ 394,52	3383,9 $\pm$ 246,55
Captopril	19445,4 $\pm$ 869,14	3476,6 $\pm$ 94,26	5862,8 $\pm$ 216,68	3779,3 $\pm$ 234,61
Propranolol	19192,9 $\pm$ 665,77	3441,6 $\pm$ 111,40	6790,5 $\pm$ 124,51	4075,8 $\pm$ 104,74
P-Valor				
C-CA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C-P	n.s.	n.s.	*	*
CA-P	n.s.	n.s.	*	n.s.

Tabla 56. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/ml muestra/min, en el plasma de los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P). *p<0,05.

4.2.2. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL.

En la Tabla 57 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble del hipotálamo de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que para la actividad Aspártico Aminopeptidasa se obtuvo un valor medio estadísticamente superior para el grupo Captopril en comparación con el del grupo Propranolol.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA ± EE				
Control	12548,6 ± 1140,38	5135,9 ± 473,98	9628,3 ± 730,80	145,3 ± 11,18
Captopril	13050,6 ± 1241,93	5573,3 ± 253,22	10422,7 ± 382,52	180,5 ± 13,50
Propanolol	11583,0 ± 966,45	4939,5 ± 353,80	9288,9 ± 486,38	128,9 ± 8,28
P-Valor				
C-CA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C-P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CA-P	n.s.	n.s.	n.s.	*

Tabla 57. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de hipotálamo correspondiente a los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P). *p<0,05.

En la Tabla 58 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana del hipotálamo de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que para la actividad Alanina Aminopeptidasa se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Propranolol en comparación con el del grupo Control, y para la actividad Aspártico Aminopeptidasa se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo propranolol en comparación con el grupo Captopril.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA ± EE				
Control	8631,8 ± 388,23	2450,8 ± 130,66	5371,3 ± 444,45	609,5 ± 49,65
Captopril	6745,7 ± 687,83	2334,8 ± 313,14	5257,3 ± 730,54	621,6 ± 81,81
Propanolol	5864,5 ± 622,51	2056,9 ± 273,48	4470,14 ± 356,42	397,7 ± 47,12
P-Valor				
C-CA	*	n.s.	n.s.	n.s.
C-P	***	n.s.	n.s.	**
CA-P	n.s.	n.s.	n.s.	**

Tabla 58. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de hipotálamo correspondiente a los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.2.3. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL.

En la Tabla 59 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble de la corteza renal de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que para las actividades Alanina y Cisteína Aminopeptidasa se obtuvieron valores medios estadísticamente inferiores para los grupos Captopril y Propranolol en comparación con los del grupo Control. Para la actividad Glutámico Aminopeptidasa se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Captopril en comparación con el del grupo Control.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA $\pm$ EE				
Control	4760,1 $\pm$ 587,56	3967,0 $\pm$ 453,75	905,4 $\pm$ 61,35	136,3 $\pm$ 11,10
Captopril	2835,1 $\pm$ 178,01	2522,0 $\pm$ 210,83	637,3 $\pm$ 52,37	107,6 $\pm$ 10,31
Propanolol	2596,8 $\pm$ 205,19	2502,6 $\pm$ 236,08	833,1 $\pm$ 29,25	139,6 $\pm$ 11,47
P-Valor				
C-CA	***	**	***	n.s.
C-P	***	**	n.s.	n.s.
CA-P	n.s.	n.s.	***	***

Tabla 59. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de corteza renal correspondiente a los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P). **p<0,01; ***p<0,001.

En la Tabla 60 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana de la corteza renal de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA ± EE				
Control	3142,1 ± 201,53	3646,1 ± 242,36	1960,1 ± 126,49	995,1 ± 78,90
Captopril	2324,1 ± 246,19	2942,1 ± 248,68	1667 ± 163,46	731,8 ± 83,56
Propanolol	2466,5 ± 123,44	2780,3 ± 175,29	1375 ± 85,35	783,5 ± 48,83
P-Valor				
C-CA	*	n.s.	n.s.	*
C-P	*	*	*	n.s.
CA-P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 60. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de corteza renal correspondiente a los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propanolol (P). *p<0,05.

En la Tabla 61 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble de la médula renal de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propanolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que para las actividades Alanina y Cisteína Aminopeptidasas se obtuvieron unos valores medios estadísticamente inferiores para el grupo Captopril en comparación con los del grupo Control.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA ± EE				
Control	6295,4 ± 666,70	5517,6 ± 441,18	1567,5 ± 117,63	93,4 ± 5,18
Captopril	4295,3 ± 295,56	3700,3 ± 257,28	1523 ± 74,28	108,3 ± 8,08
Propanolol	5154,6 ± 417,10	5016,3 ± 293,74	1690,8 ± 122,07	113,6 ± 8,79
P-Valor				
C-CA	*	**	n.s.	n.s.
C-P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CA-P	n.s.	**	n.s.	n.s.

Tabla 61. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de médula renal correspondiente a los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propanolol (P). *p<0,05; **p<0,01.

En la Tabla 62 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana de la médula renal de los grupos Control (n=8),

Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los tres grupos. Observamos que para la actividad Cisteína Aminopeptidasa se obtuvo un valor medio estadísticamente inferior para el grupo Captopril en comparación con el del grupo Control. Para la actividad Aspartato Aminopeptidasa el valor medio obtenido para el grupo Captopril fue estadísticamente inferior a los valores medios de los grupos Control y Propranolol.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA ± EE				
Control	5515,1 ± 262,52	6332,3 ± 296,70	3369,9 ± 156,28	1177,5 ± 55,43
Captopril	3956,8 ± 207,21	4756,1 ± 239,82	2544,9 ± 136,74	863,9 ± 36,60
Propanolol	4603,5 ± 355,84	5780,8 ± 313,26	3154,9 ± 156,78	929,9 ± 39,31
P-Valor				
C-CA	**	*	n.s.	***
C-P	n.s.	n.s.	n.s.	***
CA-P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 62. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de médula renal correspondiente a los grupos Control (C), Captopril (CA) y Propranolol (P). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: L-NAME.

4.3.1. INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: L-NAME. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO.

En la Tabla 63 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en el plasma de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-AP	CYS-AP	GLU-AP	ASP-AP
MEDIA ± EE				
Control	18712,3 ± 1260,38	3531,4 ± 196,29	5557,1 ± 394,52	3383,9 ± 246,55
L-NAME	17529,1 ± 1049,04	3386,9 ± 230,19	5648,4 ± 373,97	3155,7 ± 239,90
P-Valor				
C-L-NAME	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 63. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/ml /min, en las muestras de plasma correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME).

4.3.2. INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: L-NAME. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL.

En la Tabla 64 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble del hipotálamo de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA ± EE				
Control	12548,6 ± 1140,38	5135,9 ± 473,98	9628,3 ± 730,80	145,3 ± 11,18
L-NAME	12218,9 ± 1039,19	5727,8 ± 633,55	10895,9 ± 978,14	131,2 ± 13,94
P-Valor				
C-L-NAME	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 64. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de hipotálamo correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME).

En la Tabla 65 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana del hipotálamo de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos que para las actividades Alanina y

Aspártico Aminopeptidasas se obtuvo un valor medio para el grupo L-NAME estadísticamente inferior al del grupo Control.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA ± EE				
Control	8631,8 ± 388,23	2450,8 ± 130,66	5371,3 ± 444,45	609,5 ± 49,65
L-NAME	5819,4 ± 653,63	1960,1 ± 237, 09	4507,5 ± 535,04	375,1 ± 36,23
P-Valor				
C-L-NAME	**	n.s.	n.s.	**

Tabla 65. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de hipotálamo correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME). **p<0,01.

4.3.3. INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: L-NAME. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL.

En la Tabla 66 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, la fracción soluble de la corteza renal de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos que para todas las actividades analizadas se obtuvieron valores medios estadísticamente inferiores en el grupo L-NAME en comparación con el grupo Control.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA ± EE				
Control	4760,1 ± 587,56	3967 ± 453,75	905,4 ± 61,35	136,3 ± 11,10
L-NAME	3064,3 ± 162,38	2730,3 ± 55,61	619,8 ± 55,61	75,50 ± 6,59
P-Valor				
C-L-NAME	***	***	***	***

Tabla 66. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de corteza renal correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME). ***p<0,001.

En la Tabla 67 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína

/min, la fracción unida a membrana de la corteza renal de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA ± EE				
Control	3142,1 ± 201,53	3646,1 ± 242,36	1960,1 ± 126,49	995,1 ± 78,90
L-NAME	3193,8 ± 253,54	3808,4 ± 342,69	2108,5 ± 250,19	846,1 ± 80,81
P-Valor				
C-L-NAME	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 67. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de corteza renal correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME).

En la Tabla 68 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble de la médula renal de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA ± EE				
Control	6295,4 ± 666,70	5517,6 ± 441,18	1567,5 ± 117,63	93,4 ± 5,18
L-NAME	5328 ± 522,79	4348,1 ± 431,05	1749 ± 137,32	113,3 ± 12,87
P-Valor				
C-L-NAME	n.s.	**	n.s.	n.s.

Tabla 68. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de médula renal correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME). **p<0,01.

En la Tabla 69 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana de la médula renal de los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos

en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos que para la actividad Aspártico Aminopeptidasa en el grupo L-NAME obtuvimos un valor medio estadísticamente inferior al del grupo Control.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA ± EE				
Control	5515,1 ± 262,52	6332,3 ± 296,70	3369,9 ± 156,28	1177,5 ± 55,43
L-NAME	6340 ± 824,18	5483,6 ± 541,66	4192,3 ± 513,85	770,1 ± 69,35
P-Valor				
C-L-NAME	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	***

Tabla 69. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de médula renal correspondiente a los grupos Control (C) y L-NAME (L-NAME). ***p<0,001.

4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS.

4.4.1. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

En la Tabla 70 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/mg. proteína /min, en el plasma de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-AP	CYS-AP	GLU-AP	ASP-AP
MEDIA ± EE				
Estándar	15961,2 ± 524,29	3057 ± 184,67	3837,8 ± 131	137,3 ± 8,49
Aceite de Oliva Virgen Extra	17069,8 ± 294,21	3069 ± 109,01	3981,5 ± 190,77	136,1 ± 7,53
P-Valor				
E-AOVE	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 70. Media ± el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA ó Asp-β-NA hidrolizados/ml /min, en las muestras de plasma correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE).

4.4.2. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

En la Tabla 71 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble del hipotálamo de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA $\pm$ EE				
Estándar	11572,0 $\pm$ 621,2	4174,0 $\pm$ 348,2	7504,0 $\pm$ 913,9	120,0 $\pm$ 15,3
Aceite de Oliva Virgen Extra	11111,0 $\pm$ 1239,8	4105,0 $\pm$ 610,8	10252,0 $\pm$ 1692,7	162,0 $\pm$ 16,1
P-Valor				
E-AOVE	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 71. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de hipotálamo correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE).

En la Tabla 72 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana del hipotálamo de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA $\pm$ EE				
Estándar	8186,0 $\pm$ 702,0	2780,0 $\pm$ 421,2	3915,0 $\pm$ 482,9	375,0 $\pm$ 61,0
Aceite de Oliva Virgen Extra	6669,0 $\pm$ 1039,5	2044,0 $\pm$ 472,1	3380,0 $\pm$ 380,1	423,0 $\pm$ 68,2
P-Valor				
E-AOVE	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 72. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de hipotálamo correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE).

4.4.3. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

En la Tabla 73 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble de la corteza renal de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA $\pm$ EE				
Estándar	3578,7 $\pm$ 196,30	3634,0 $\pm$ 222,92	957 $\pm$ 92,18	148 $\pm$ 19,4
Aceite de Oliva Virgen Extra	3520 $\pm$ 26	3981,1 $\pm$ 176,36	991 $\pm$ 102,66	142 $\pm$ 18,0
P-Valor				
E-AOVE	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabla 73. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de corteza renal correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE).

En la Tabla 74 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana de la corteza renal de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos como para las actividades Alanina y Aspártico Aminopeptidasas obtuvimos en el grupo AOVE valores medios estadísticamente superiores a los del grupo Estándar.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA $\pm$ EE				
Estándar	5511,4 $\pm$ 209,74	3315,1 $\pm$ 237,32	1304 $\pm$ 139	390 $\pm$ 69
Aceite de Oliva Virgen Extra	7155,8 $\pm$ 528,45	3046,0 $\pm$ 75,48	1375 $\pm$ 202	977 $\pm$ 228
P-Valor				
E-AOVE	*	n.s.	n.s.	*

Tabla 74. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de corteza renal correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE).

*p<0,05.

En la Tabla 75 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción soluble de la médula renal de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las actividades analizadas.

	ALA-APsol	CYS-APsol	GLU-APsol	ASP-APsol
MEDIA $\pm$ EE				
Estándar	3400,2 $\pm$ 265,76	3608,9 $\pm$ 309,16	1759 $\pm$ 197,1	80 $\pm$ 8,0
Aceite de Oliva Virgen Extra	3385,9 $\pm$ 185,46	3733,6 $\pm$ 182,05	1352 $\pm$ 132,8	72 $\pm$ 10,5
P-Valor				
E-AOVE	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabla 75. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción soluble de médula renal correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE).

En la Tabla 76 se presentan las medias y el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina, Cisteína, Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína /min, en la fracción unida a membrana de la médula renal de los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental; así como los valores de P obtenidos en las comparaciones entre los dos grupos. Observamos que para la actividad Alanina Aminopeptidasa obtuvimos un valor medio en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra estadísticamente superior al del grupo Estándar, mientras que para las actividades Glutámico y Aspártico Aminopeptidasa la media en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue estadísticamente inferior a la del grupo Estándar.

	ALA-APmb	CYS-APmb	GLU-APmb	ASP-APmb
MEDIA $\pm$ EE				
Estándar	3252,3 $\pm$ 230,89	4536,5 $\pm$ 255,03	3737 $\pm$ 679,6	752 $\pm$ 156,8
Aceite de Oliva Virgen Extra	4478,4 $\pm$ 241,53	4178,4 $\pm$ 136,72	2007 $\pm$ 343,3	235 $\pm$ 45,4
P-Valor				
E-AOVE	**	<i>n.s.</i>	*	**

Tabla 76. Media $\pm$ el error estándar (EE) de los valores de actividad Alanina (ALA-AP), Cisteína (CYS-AP), Glutámico (GLU-AP) y Aspártico (ASP-AP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg proteína/min, en la fracción unida a membrana de médula renal correspondiente a los grupos Estándar (E) y Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE). *p<0,05; **p<0,01.

Discusión

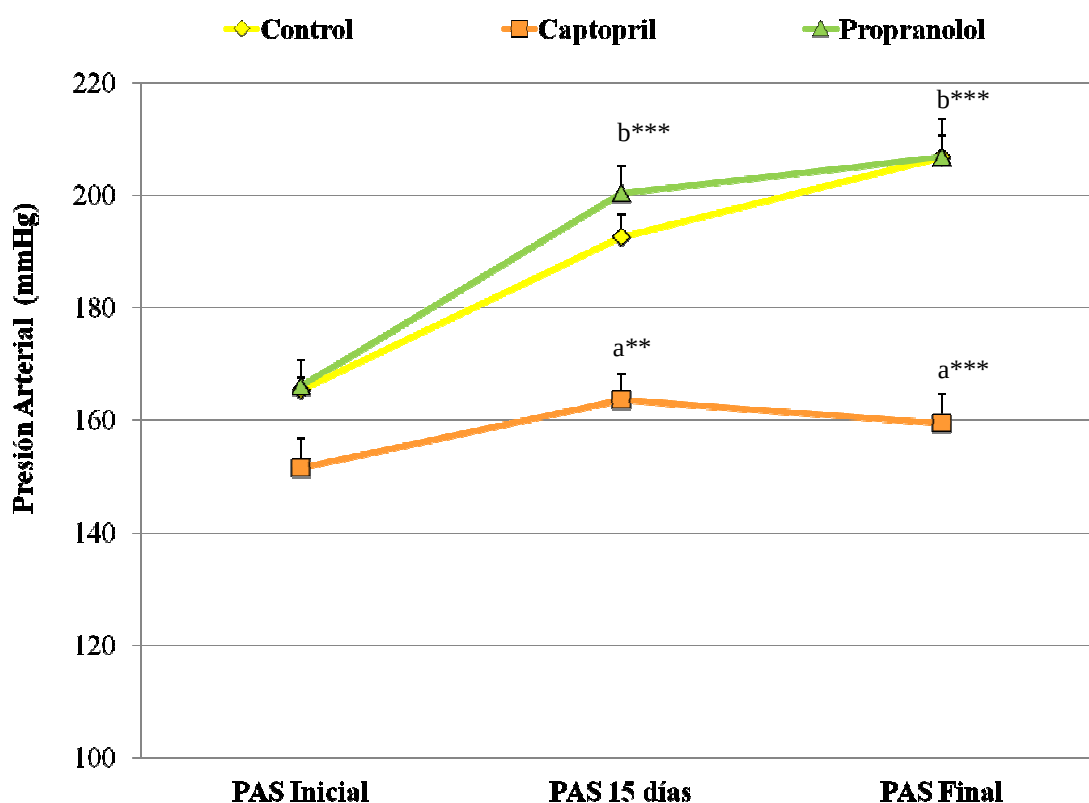
5. DISCUSIÓN

5.1. ESTUDIO METABÓLICO Y FISIOLÓGICO

5.1.1. EFECTO DE FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL

Evolución de los valores de Presión Arterial Sistólica

En la Gráfica 1 se muestran los valores de presión arterial sistólica (PAS) al comienzo del periodo experimental (inicial), a los 15 días de tratamiento y a los 30 días (final) para los grupos Control, Captopril y Propranolol.



Gráfica 1. Valores medios $\pm$ error estándar de Presión Arterial Sistólica (expresados en milímetros de mercurio, mmHg) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) durante el periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas, y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control; b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Observamos que el grupo tratado con Propranolol muestra una evolución para los valores de PA similar a los animales del grupo Control, alcanzándose valores cercanos a los 200 mmHg a los 15 días de iniciado el tratamiento ($192,5 \pm 2,35$ y $200,3$

$\pm 5,00$). Sin embargo, el tratamiento con Captopril sí que consigue un mantenimiento en los valores de PA cercanos a los 150 mmHg iniciales ($163,6 \pm 4,72$ a los 15 días de tratamiento y $159,4 \pm 5,28$ al mes).

Hay que tener en cuenta que en el modelo SHR son varios los genes implicados en la aparición de la hipertensión, por lo que es un modelo animal que mimetiza bastante bien la hipertensión esencial o primaria en humanos (Pinto et al., 1998). El mecanismo de desarrollo de la hipertensión SHR es atribuido tanto a alteraciones neuronales como vasculares, y las variaciones individuales en el genotipo SHR pueden influir tanto en la evolución de la hipertensión como en las alteraciones en distintos órganos. Se sabe que son tres los principales genes implicados en el aumento de la presión arterial en este modelo, y que un cuarto gen localizado en el cromosoma 10 contribuye al mantenimiento de la hipertensión en los animales adultos (Yamori, 1999; O'Shaughnessy, 2001). También se sabe que los andrógenos podrían estar implicados en el mantenimiento de la hipertensión, y en la aparición de daño renal en este modelo mediante la alteración de la natriuresis por presión y el feedback túbulo-glomerular, de forma muy similar a como ocurre en los humanos hipertensos (Reckelhoff y Granger, 1999). Este efecto de los andrógenos hace también a los animales SHR un buen modelo de la hipertensión postmenopáusica en humanos (Fortepiani et al., 2003).

Como se ha indicado en la introducción, el Captopril pertenece a un grupo de fármacos denominados “inhibidores del enzima convertidor de angiotensina” (IECA) cuyo efecto sobre los valores de presión arterial es debido a la inhibición del enzima que transforma la Ang I en Ang II, principal péptido activo del SRA (Breckenridge, 1988). El Captopril es un potente inhibidor de las acciones de la Ang II en todo el organismo. Sólo ocasiona una pequeña disminución de la PA en animales normales, pero en animales hipertensos provoca una reducción mucho mayor de la PA, sobre todo en los modelos en los que está estimulada la secreción de renina, aunque no está del todo clara la relación entre la disminución de la PA observada en los animales SHR y la disminución de la actividad ECA en plasma (Zhang et al., 1996). No obstante, hay estudios que apoyan la participación del RAS en este tipo de hipertensión y el efecto beneficioso de la administración de algunos péptidos de este sistema con acciones contrapuestas a las de la AngII (Benter et al., 2011).

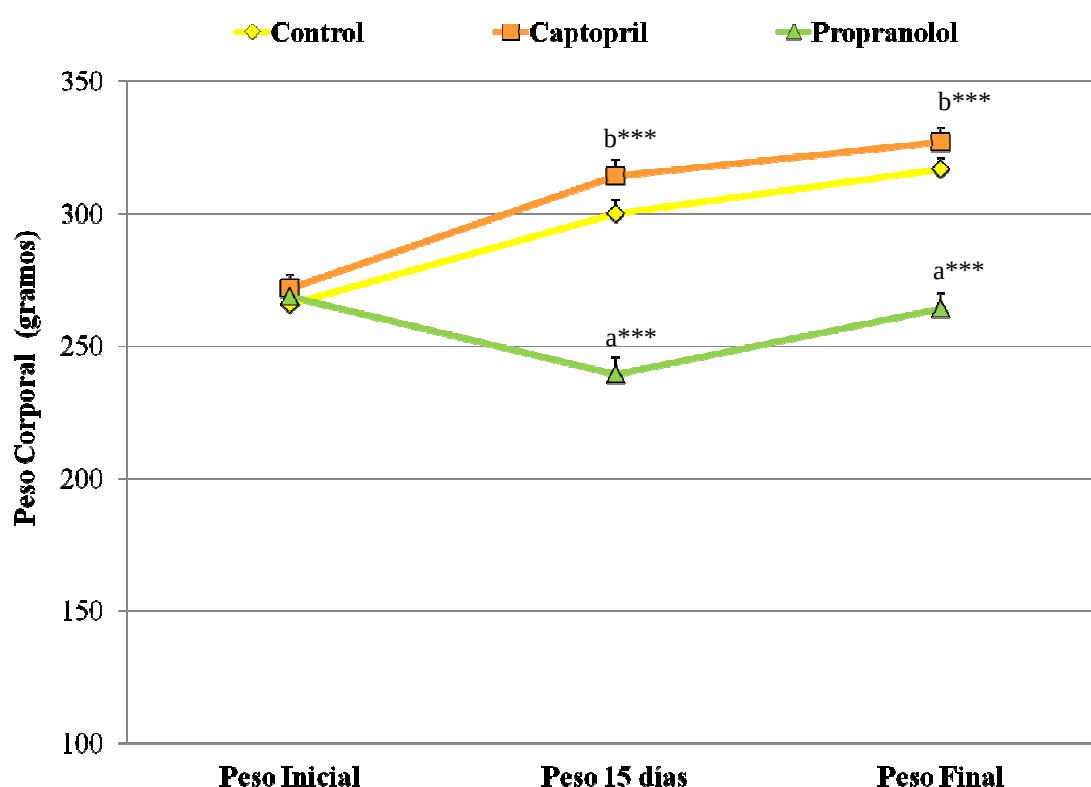
El modelo genético de hipertensión SHR también se caracteriza por un aumento de la frecuencia cardiaca y de las concentraciones en plasma de catecolaminas y

actividad dopamina- β -hidrolasa, factores todos ellos indicativos de una sobreactividad del SNS (Nagatsu et al., 1974; Zhang y Thorén, 1998; Klemola et al., 1999). Los β -bloqueantes, entre los que se encuentra el propranolol, tienen una reconocida actividad antihipertensiva debida a la disminución del gasto cardiaco, de la liberación de renina a partir de los riñones y la inhibición de la acción de las catecolaminas endógenas (Graham et al., 2008). A pesar de ello, en los resultados obtenidos no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de PA del grupo Control y Propranolol. Esta falta de efecto sobre los valores de presión arterial puede deberse a la duración del periodo de administración del fármaco, de cuatro semanas, mientras que en trabajos en los que si se indican efectos hipotensores la administración se prolongaba hasta 12 semanas (Nguyen et al., 1998; Sato et al., 2010). Sin embargo, otros autores tampoco observan efecto del propranolol sobre la presión arterial (de Blois et al., 1997).

En comparación con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en animales normotensos (ratas WKY) tratados con captopril, la reducción en los valores de PA (20%) fue superior (Villarejo et al., 2012). Sin embargo, el tratamiento con propranolol no mostró diferencias en los valores de PA ni en los animales WKY (Ramírez et al., 2009) ni en los SHR (Segarra et al., 2012).

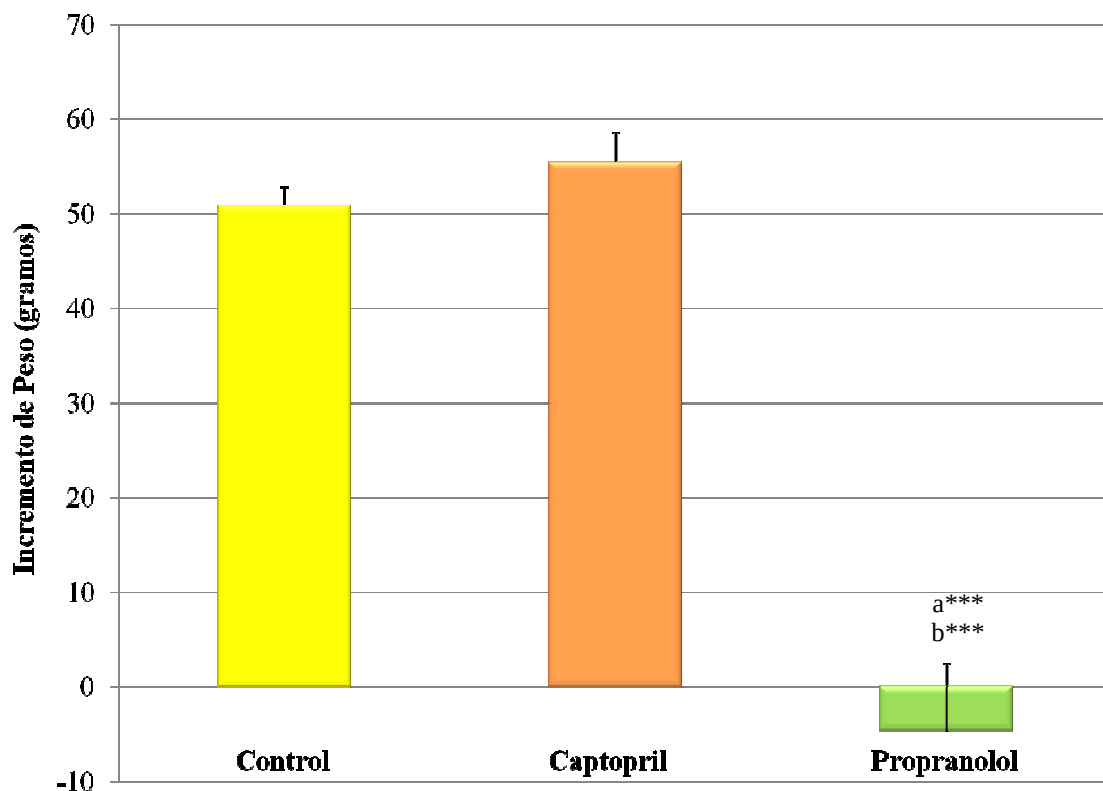
Evolución del peso corporal e ingesta de alimento

En la Gráfica 2 se muestra la evolución del peso corporal para los tres grupos de animales. Al contrario de lo comentado con respecto a los cambios en la PA, el tratamiento con Propranolol es el único que parece tener efectos sobre los valores de peso corporal, cuyo incremento es significativamente menor para este grupo de animales, estableciéndose diferencias estadísticamente significativas ya a los 15 días de tratamiento, que se mantienen al mes.



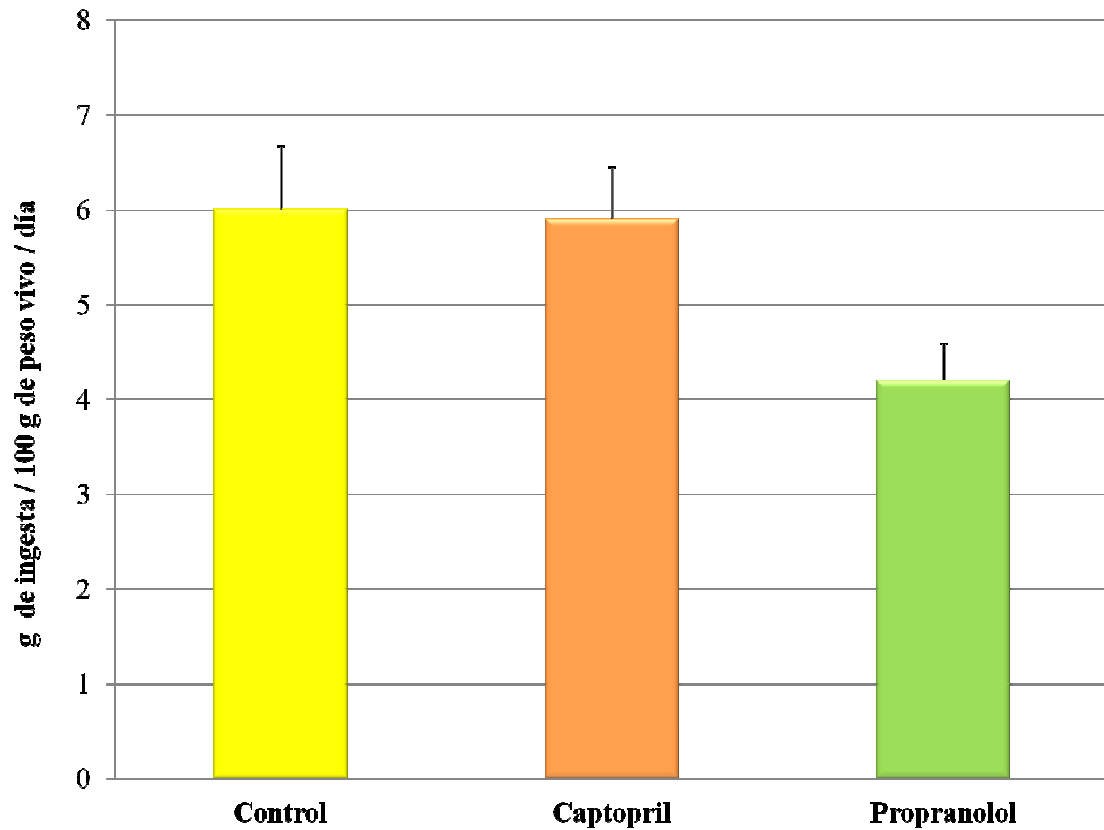
Gráfica 2. Valores medios $\pm$ error estándar de peso corporal (expresados en gramos) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), durante todo el periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control; b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol. *** $p < 0,001$.

De acuerdo con la evolución del peso corporal, en la Gráfica 3 se observa cómo mientras para los animales tratados con Captopril el incremento total de peso fue positivo y similar al del grupo control ($55,4 \pm 3,18$ vs $50,9 \pm 1,88$) en el grupo que recibió el Propranolol tuvo lugar una disminución de masa corporal que se reflejó en un valor negativo de incremento de peso ($-4,7 \pm 7,17$).



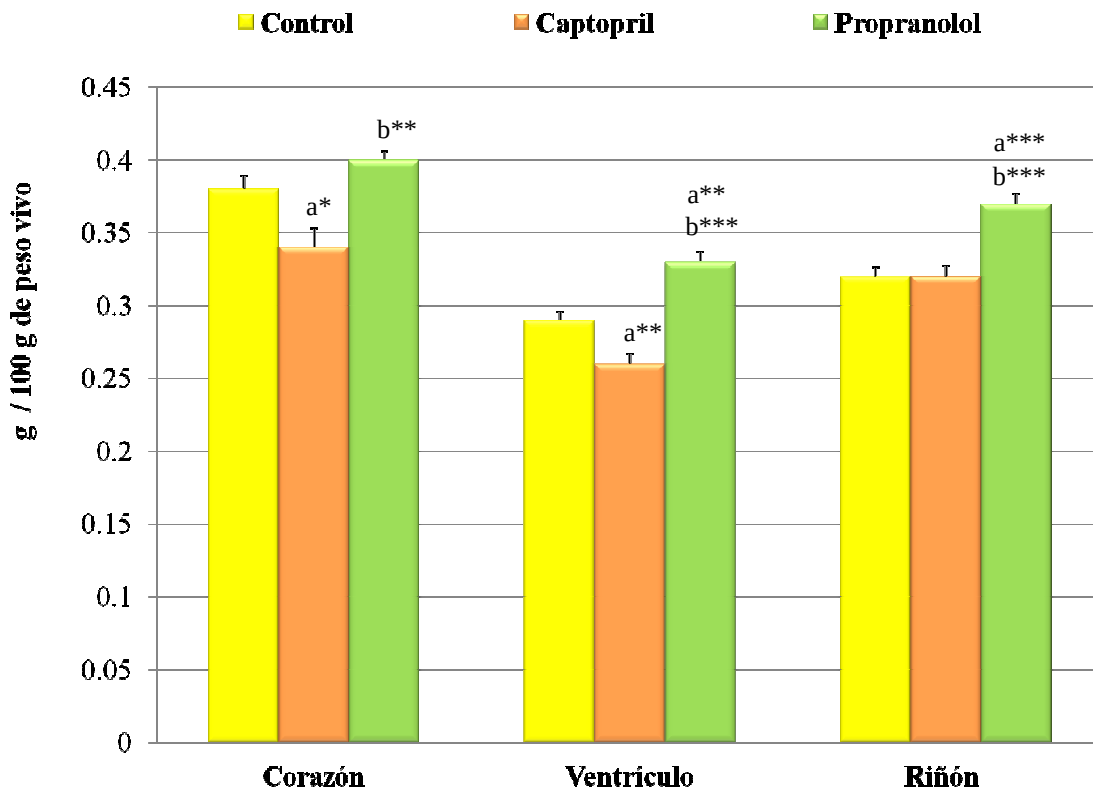
Gráfica 3. Valores medios $\pm$ error estándar del incremento total de peso corporal (expresados en gramos) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al finalizar el periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control; b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol. *** $p < 0,001$.

Este resultado está de acuerdo con los menores valores medios de ingesta de alimento en el grupo al que se le administró Propranolol y que podemos observar en la Gráfica 4 ($4,2 \pm 0,39$ para Propranolol vs $6,0 \pm 0,67$ para el grupo Control y $5,9 \pm 0,55$ para el grupo Captopril). Este dato nos permite concluir que los menores valores de peso corporal al final del periodo experimental son debidos fundamentalmente a la menor ingesta de alimento en el grupo tratado con Propranolol.



Gráfica 4. Valores medios $\pm$ error estándar de la ingesta de alimento (expresados en g por 100 gramos de peso vivo y día) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), al finalizar el periodo experimental.

En la Gráfica 5 se representan los valores porcentuales (g/100 g de peso vivo (PV)) del corazón, ventrículo izquierdo y riñón, observándose que estos tres órganos muestran pesos proporcionalmente superiores en el grupo Propranolol, mientras que en el grupo Captopril estos valores son estadísticamente inferiores frente a los controles para el corazón completo y el ventrículo izquierdo, efecto ya descrito en los animales SHR (Miguel-Carrasco et al., 2010; Segarra et al., 2013). El efecto del Propranolol sobre el peso de estos órganos es contrario a lo descrito en la literatura (Weiss y Lundgren, 1978).

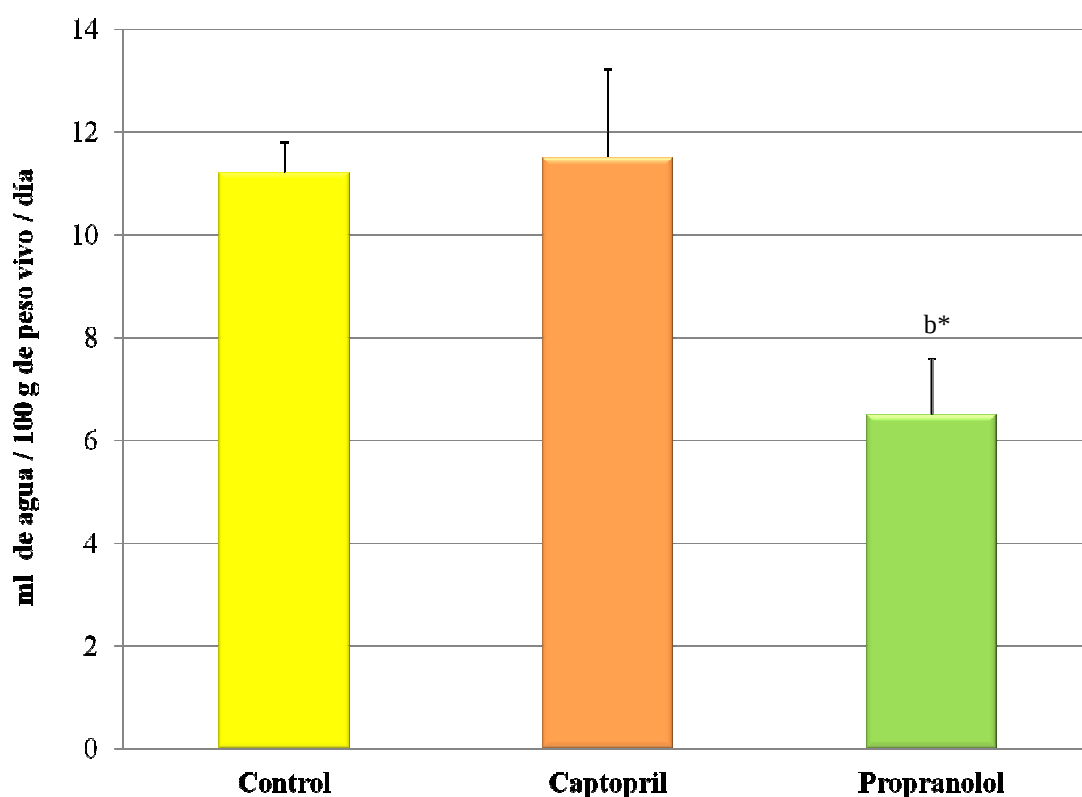


Gráfica 5. Valores medios $\pm$ error estándar del peso de corazón, ventrículo izquierdo y riñón (expresados en gramos por 100g de peso vivo) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control; b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

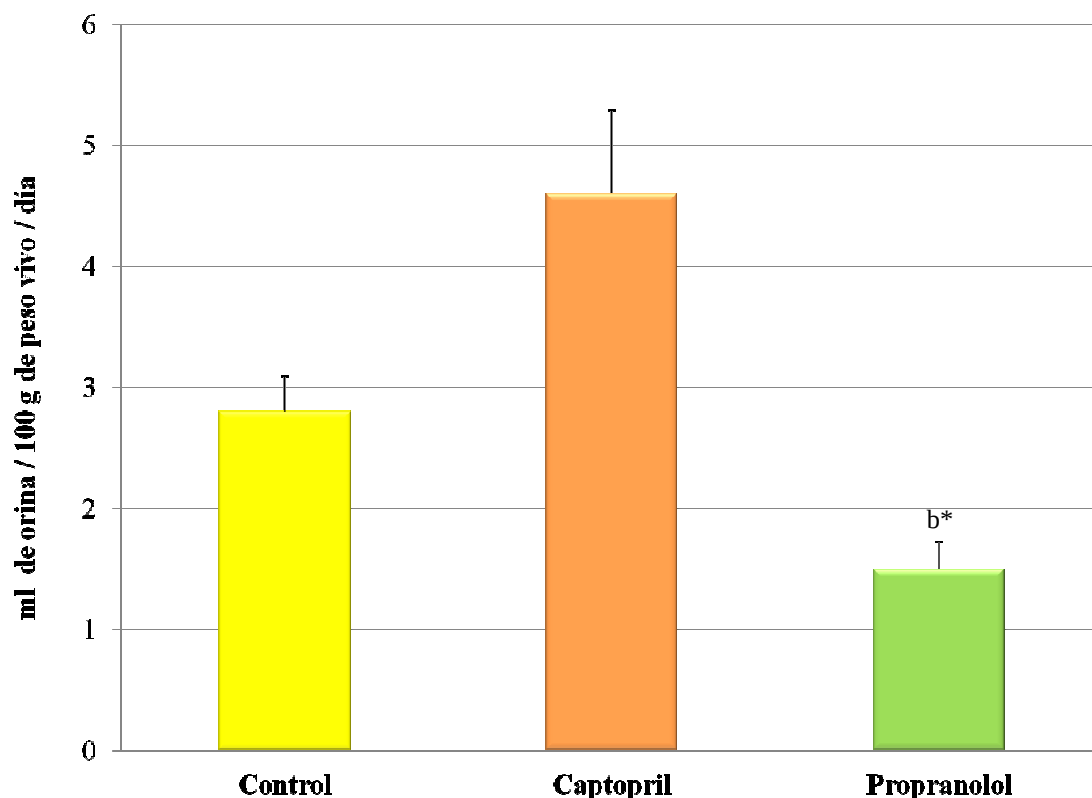
Las diferencias en los valores de peso corporal entre el grupo Control y el grupo Propranolol son en parte debidas al efecto bien conocido de los β -bloqueantes sobre la ingesta de alimento (Tsujii y Bray, 1998; Bray, 2000). En el caso del Captopril, el tratamiento con este tipo de fármacos se ha relacionado con un efecto preventivo sobre el desarrollo de la obesidad y la resistencia a la insulina, tanto en animales a los que se les administra una dieta alta en grasa como en aquellos que reciben una dieta estándar, si bien dicho efecto se ha demostrado sólo en cepas de ratas normotensas (Kloet et al., 2009). En el caso de animales hipertensos, estudios realizados con ratas de la estirpe SHROB, un modelo de síndrome metabólico que presenta hipertensión y obesidad, la administración de Captopril no afectó ni a la ingesta ni al incremento de peso corporal (Ernsberger et al., 2007).

Ingesta de bebida, diuresis y balance hídrico

En las Gráficas 6 y 7 aparecen los valores de ingesta de bebida y diuresis para los tres grupos experimentales. Se observa para el grupo Propranolol una menor ingesta de agua, aunque sólo se establecen diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Captopril. Por el contrario, el grupo Captopril presentó unos mayores valores de diuresis, aunque las diferencias estadísticamente significativas sólo se establecieron con el grupo Propranolol. Como consecuencia, el balance hídrico fue sensiblemente inferior para el grupo tratado con Propranolol.



Gráfica 6. Valores medios $\pm$ error estándar de la ingesta de bebida (expresados en ml por 100 gramos de peso vivo y día) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8) al final del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control; b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol; * $p < 0,05$.



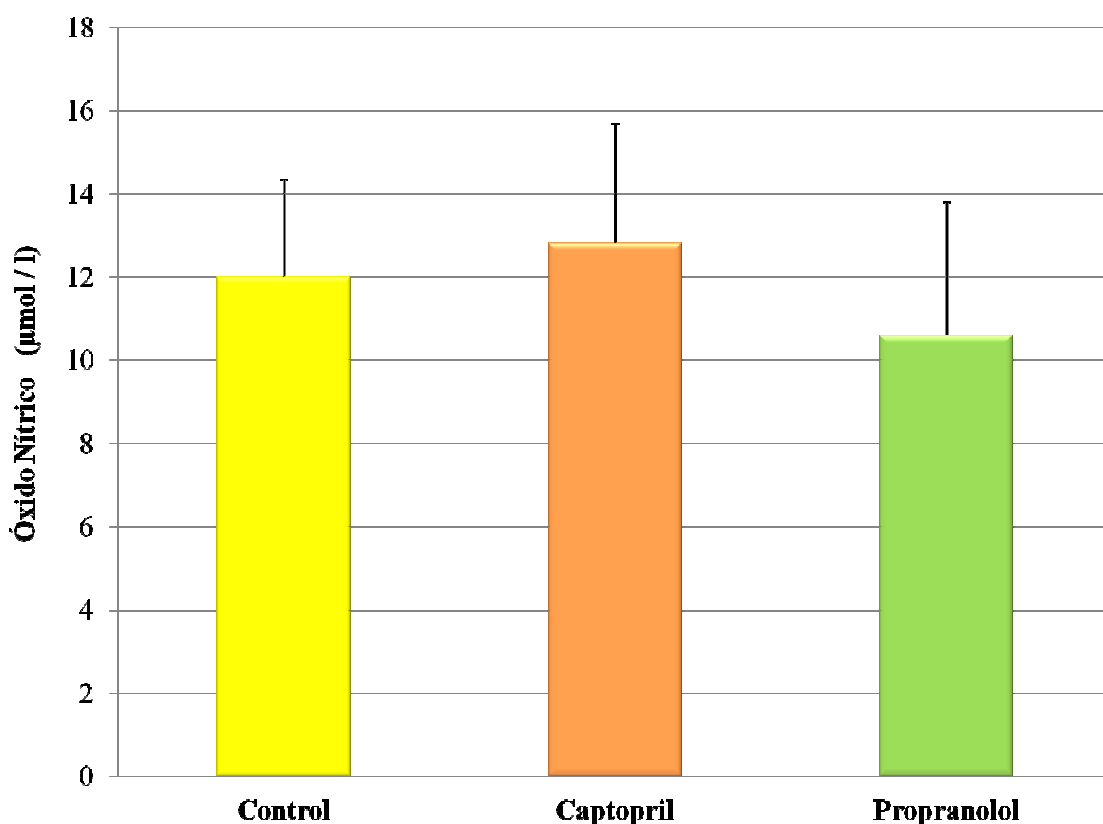
Gráfica 7. Valores medios $\pm$ error estándar de diuresis (expresados en ml excretados de orina por 100 gramos de peso vivo y día) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), al finalizar el periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control; b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol. * $p < 0,05$.

Estos resultados indicarían que, al menos en parte, el mantenimiento de los valores de PA en el grupo Captopril estaría condicionado a un incremento de la diuresis. Este efecto podría estar relacionado con la disminución descrita en los niveles plasmáticos de vasopresina en ratas SHR tratadas con Captopril (Zhang et al., 1996), o con cambios en las rutas metabólicas de las angiotensinas en distintos órganos como consecuencia de la inhibición del ECA (Villarejo et al., 2012).

En los animales normotensos (Villarejo et al., 2012) los resultados obtenidos tras el tratamiento con Captopril difieren de los presentados en esta tesis, ya que en el primer caso tanto los valores de ingesta de agua como los de diuresis fueron significativamente mayores después del tratamiento con Captopril.

Parámetros sanguíneos: valores de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracciones de colesterol en plasma.

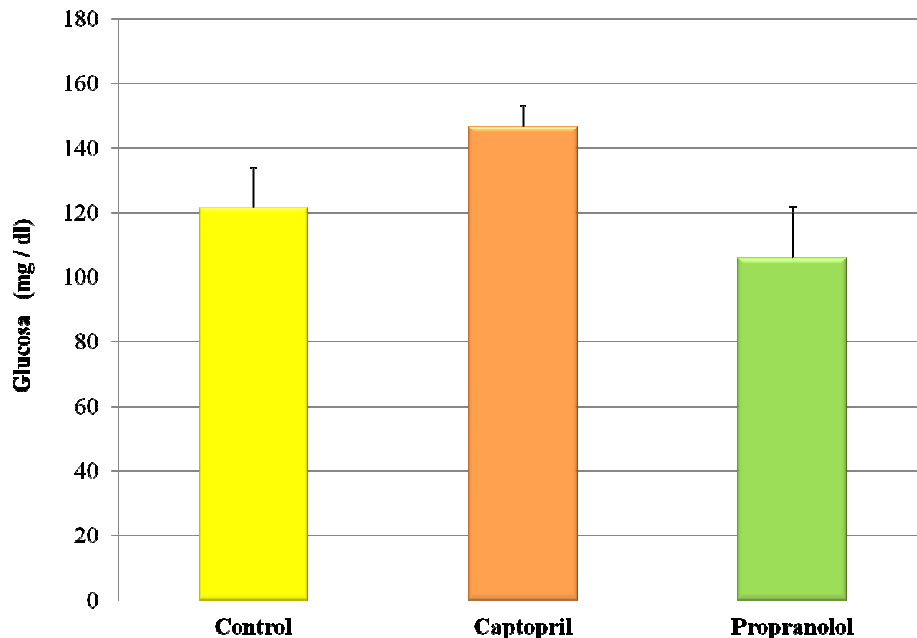
En la Gráfica 8 se muestran los valores plasmáticos de óxido nítrico para el grupo Control y los grupos tratados con Captopril y Propranolol, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Estos resultados son en principio contradictorios con la elevación de los niveles de NO descrita en ratas SHR tratadas con captopril (Miguel-Carrasco et al., 2010) y la conocida relación entre el NO y el funcionamiento del SNS (Jordan et al., 2001).



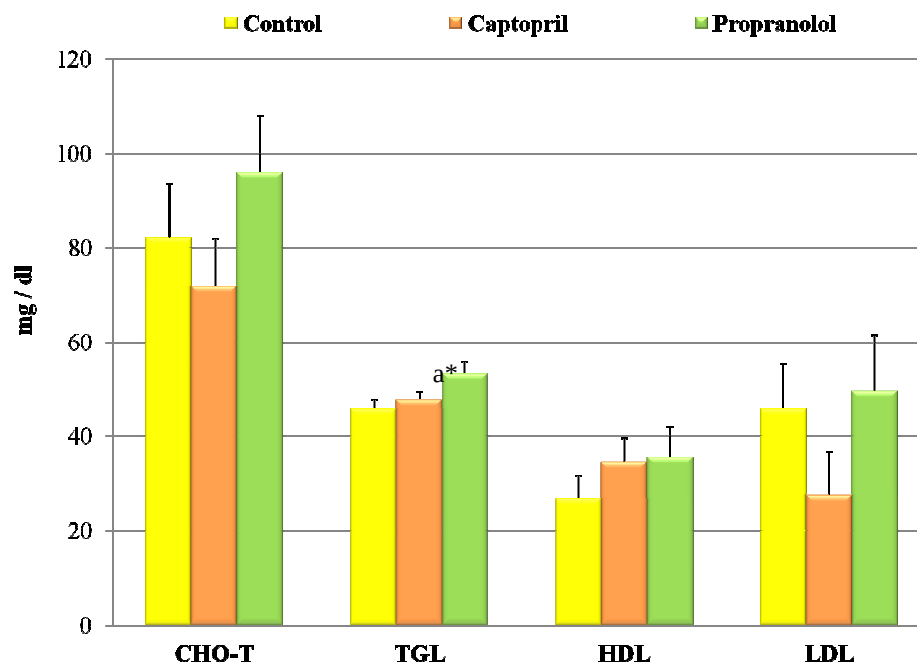
Gráfica 8. Valores medios $\pm$ error estándar de la concentración de óxido nítrico en el plasma de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como $\mu\text{mol/l}$.

En las Gráficas 9 y 10 se representan, respectivamente, los valores de glucemia basal y el perfil lipídico en sangre de los tres grupos estudiados. En el caso de la glucemia, aunque no se alcanza significación estadística debido a la gran variabilidad de datos, si que podemos observar valores medios ligeramente superiores para el grupo Captopril. La concentración de los lípidos plasmáticos también presenta una gran variabilidad dentro de cada grupo, por lo que sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en el caso de los triglicéridos, observándose un

incremento con respecto al grupo control, aunque tanto estos como el colesterol total y la fracción HDL alcanzan medias superiores en el grupo tratado con Propranolol lo que coincide con los resultados descritos por Jansen y Baggen, (1987) y Darga et al., (1991).



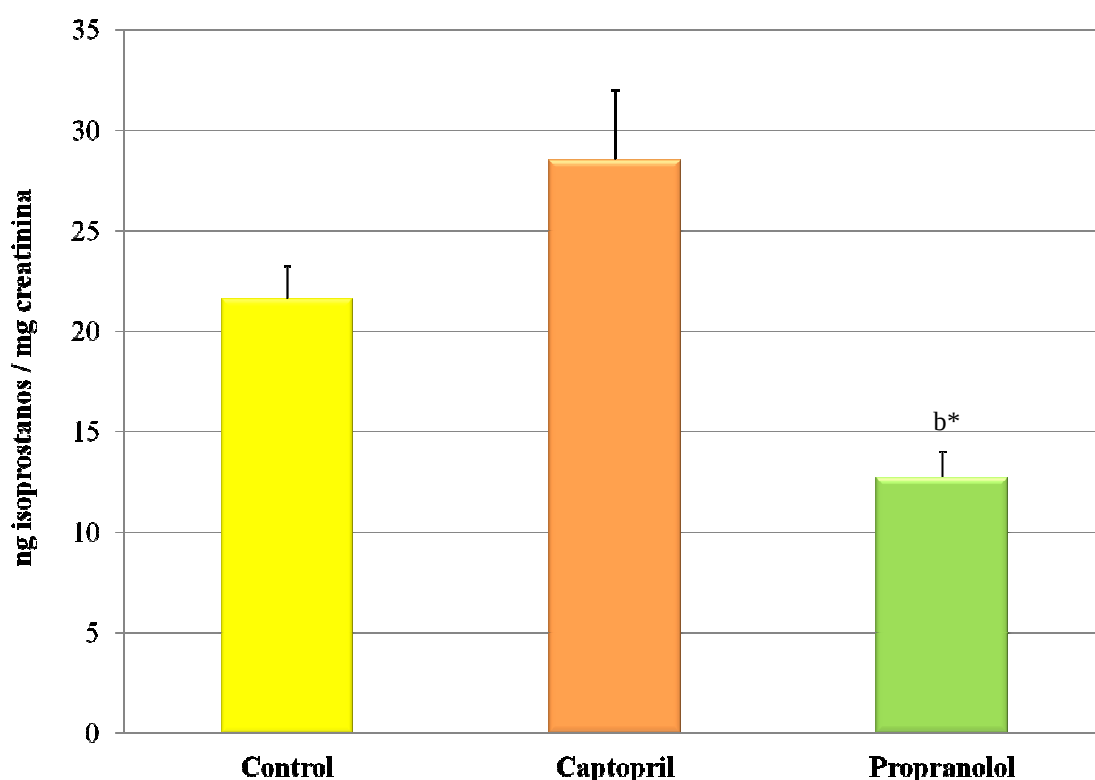
Gráfica 9. Valores medios $\pm$ error estándar de los valores de glucemia basal en el plasma de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como mg/dl.



Gráfica 10. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de triglicéridos y colesterol total en sangre, así como de la fracciones de colesterol HDL y LDL, (expresados en miligramos por decilitro) para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. a: diferencias con respecto al grupo Control. * $p < 0,05$.

Niveles de estrés oxidativo

El estudio del estado oxidativo se realizó mediante la determinación de los niveles de 8-isoprostano en orina. En la Gráfica 11 se muestran los valores medios para los tres grupos de animales. Los valores más elevados se obtuvieron para el grupo tratado con Captopril, aunque sólo se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre dicho grupo y los animales que habían recibido Propranolol, datos que no apoyarían un efecto protector de los inhibidores del ECA frente a los daños por estrés oxidativo, al menos en este modelo animal (Yu et al., 2006).

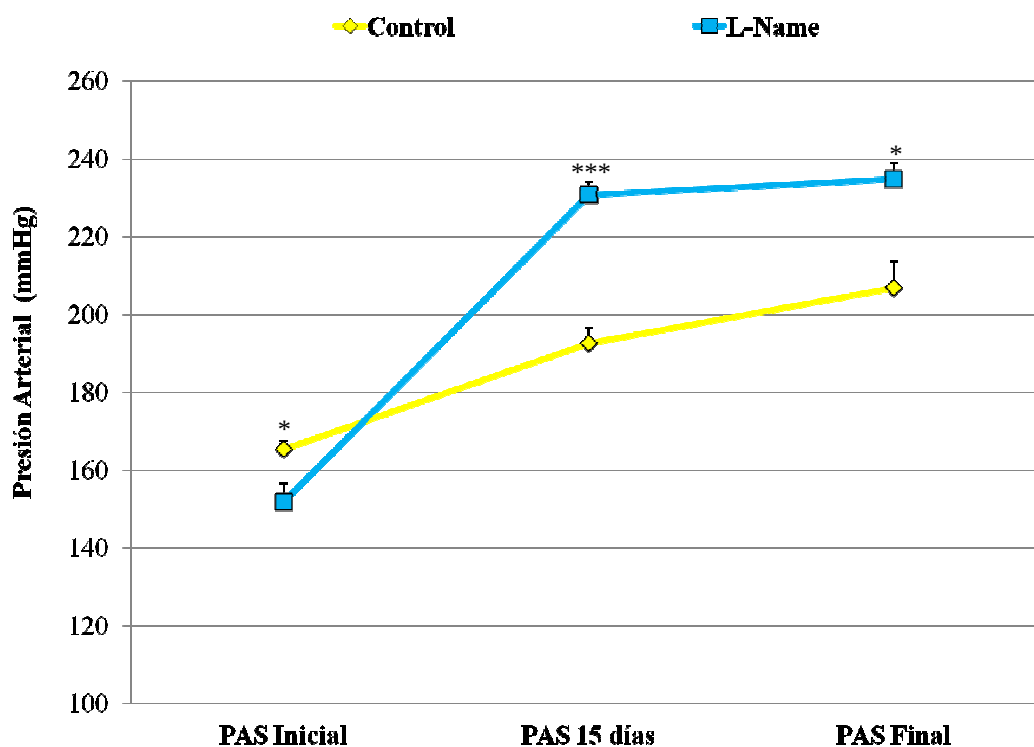


Gráfica 11. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de 8-isoprostanos en orina de los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como ng de isoprostanos/mg de creatinina. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen. b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol. * $p < 0,05$.

5.1.2. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE L-NAME

Evolución de los valores de Presión Arterial Sistólica

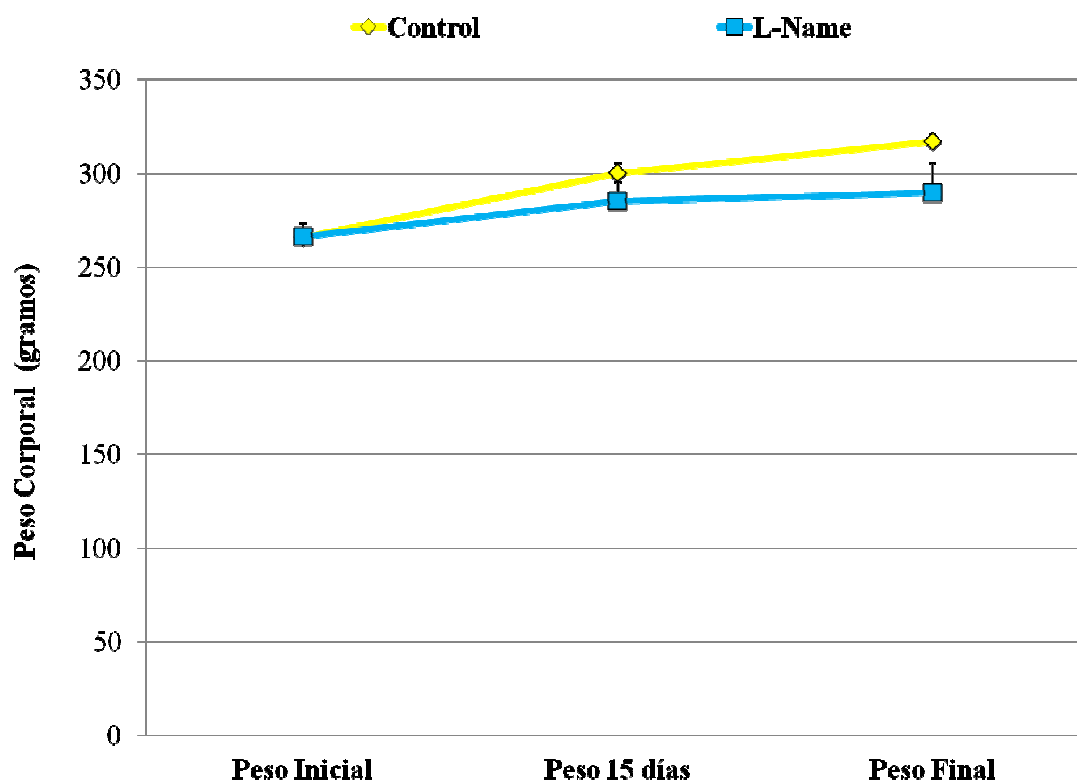
En la Gráfica 12 se representa la evolución de los valores de PA en el grupo L-NAME frente a los controles. Como era de esperar, la administración de L-NAME y la consecuente inhibición en la formación de óxido nítrico, se reflejó en un aumento mucho más pronunciado de los valores de PA que alcanzaron niveles de $230,7 \pm 3,25$ mmHg frente a los $192,5 \pm 4,08$ del grupo Control a los 15 días de administración del inhibidor (Vives et al., 2011). Sin embargo, a los 30 días, aunque los valores en el grupo L-NAME seguían siendo superiores a los controles, la diferencia no aumentó, incluso se redujo a 28 mmHg. Estos resultados son consistentes con los niveles de NO aumentados en ratas SHR y la sobreexpresión de la NOS en distintos tejidos de estos animales (Llorens et al., 2007). Sin embargo, el aumento en los valores de PA fue inferior al descrito en animales normotensos (42% de incremento) sometidos al mismo tratamiento (Segarra et al., 2010).



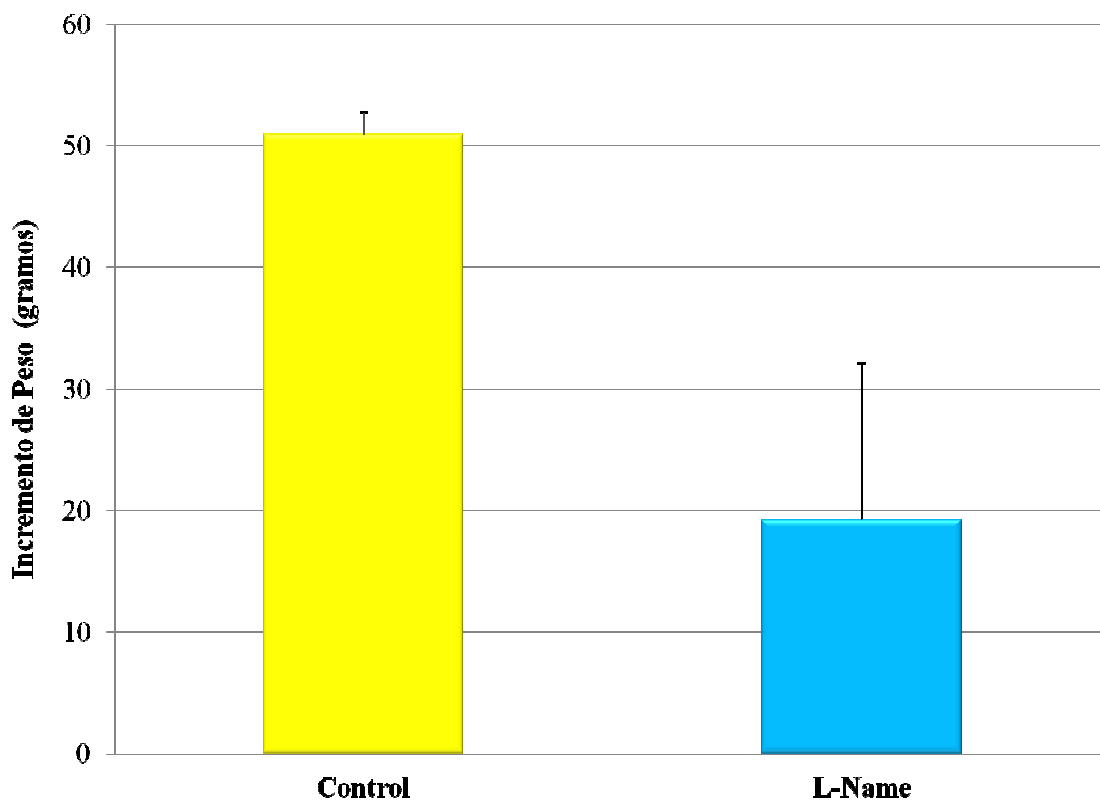
Gráfica 12. Valores medios $\pm$ error estándar de Presión Arterial Sistólica (PAS) (expresados en milímetros de mercurio, mmHg) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), a lo largo del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos: *p< 0,05; ***p<0,001.

Evolución del peso corporal e ingesta de alimento

En la Gráfica 13 se muestra la evolución de los valores de peso corporal de los grupos Control y L-NAME durante todo el tratamiento, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ni a los 15 ni a los 30 días de tratamiento, aunque la media de incremento total de peso del grupo Control superó en más de 30 g a la del grupo L-NAME (Gráfica 14).

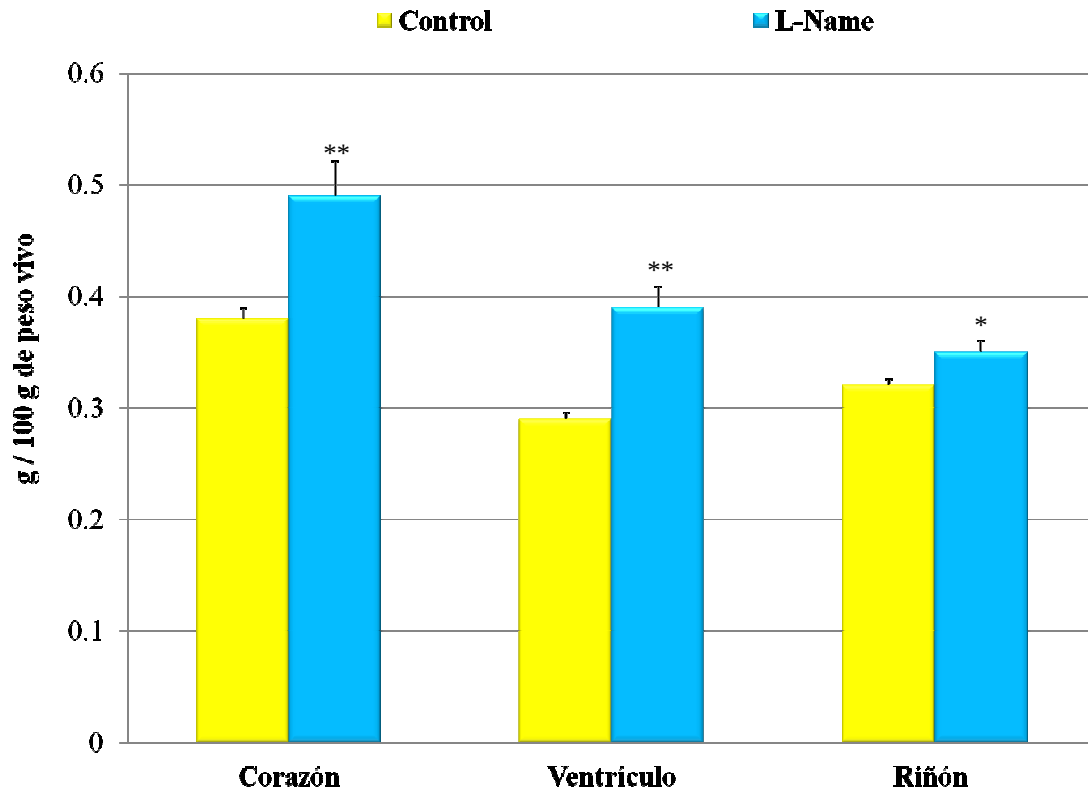


Gráfica 13. Valores medios $\pm$ error estándar de peso corporal (expresados en gramos) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), durante toda la fase experimental.



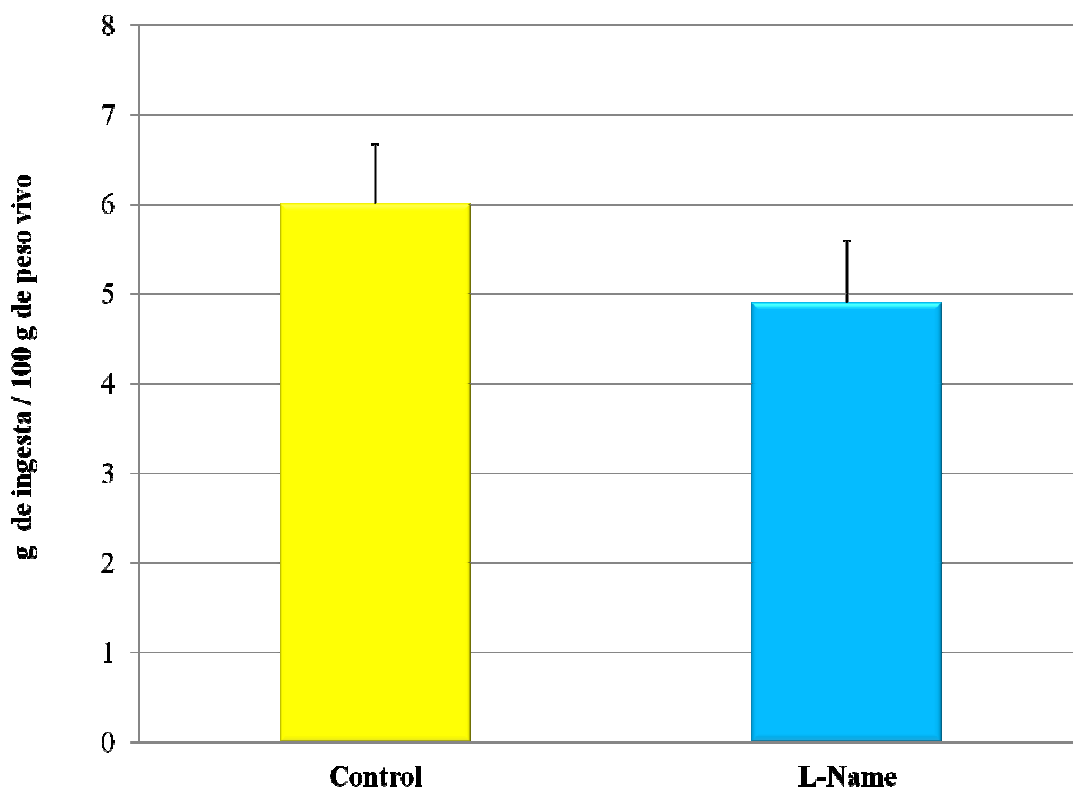
Gráfica 14. Valores medios $\pm$ error estándar del incremento total de peso corporal (expresados en gramos) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), durante todo el proceso experimental.

Estas diferencias en el peso corporal también se reflejaron en el valor porcentual del peso de los órganos en el sacrificio (Gráfica 15) alcanzándose valores estadísticamente superiores para el grupo L-NAME, datos coincidentes con los efectos conocidos de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico en estirpes de ratas normotensas (Sanada et al., 2001). Estos resultados también están en concordancia con el aumento en el tamaño del ventrículo izquierdo descrita en ratas hipertensas tras el tratamiento con L-NAME (Orange et al., 2000) y con la hipertrofia renal en este mismo tipo de animales (Vaskonen et al., 1997).



Gráfica 15. Valores medios $\pm$ error estándar del peso del corazón, ventrículo izquierdo y riñón (expresados en gramos por 100g de peso vivo) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), al final del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

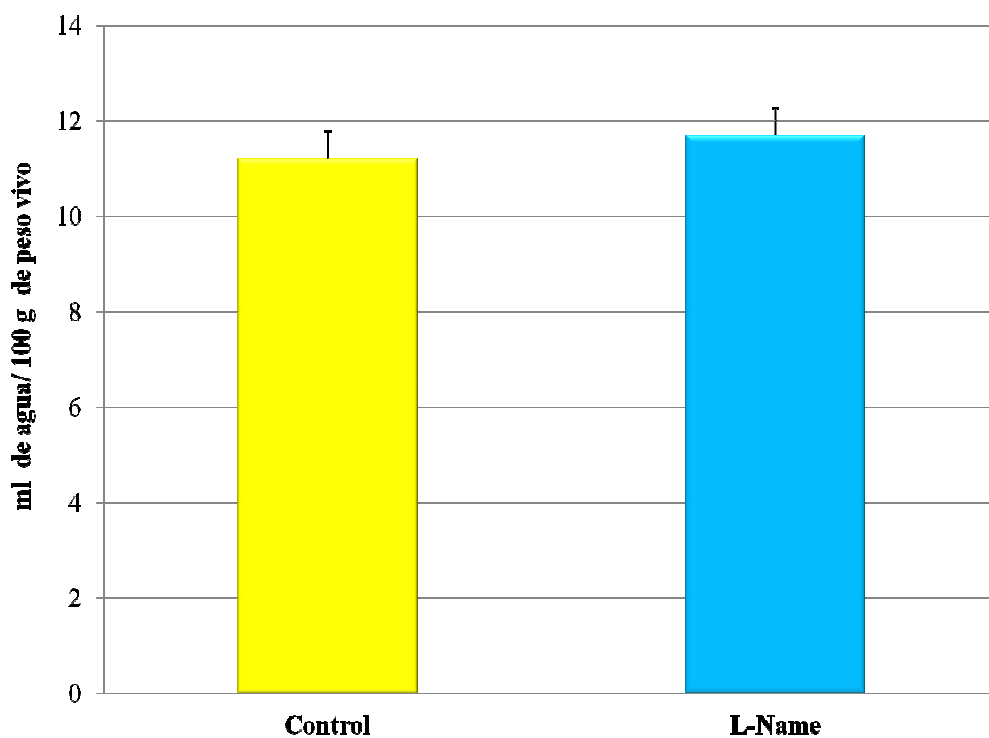
De forma paralela a la evolución del peso corporal, la ingesta de alimento al final del periodo experimental fue también menor para el grupo L-NAME aunque sin alcanzar significación estadística (Gráfica 16).



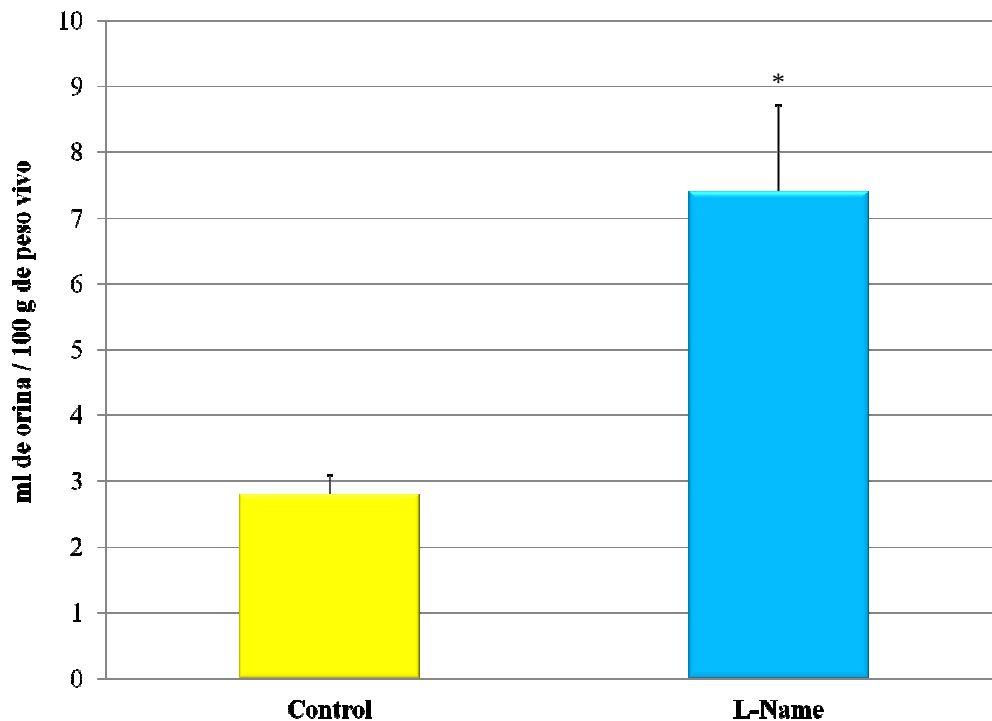
Gráfica 16. Valores medios $\pm$ error estándar de ingesta de alimento (expresados en g por 100 gramos de peso vivo) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), al final de la fase experimental.

Ingesta de bebida, diuresis y balance hídrico

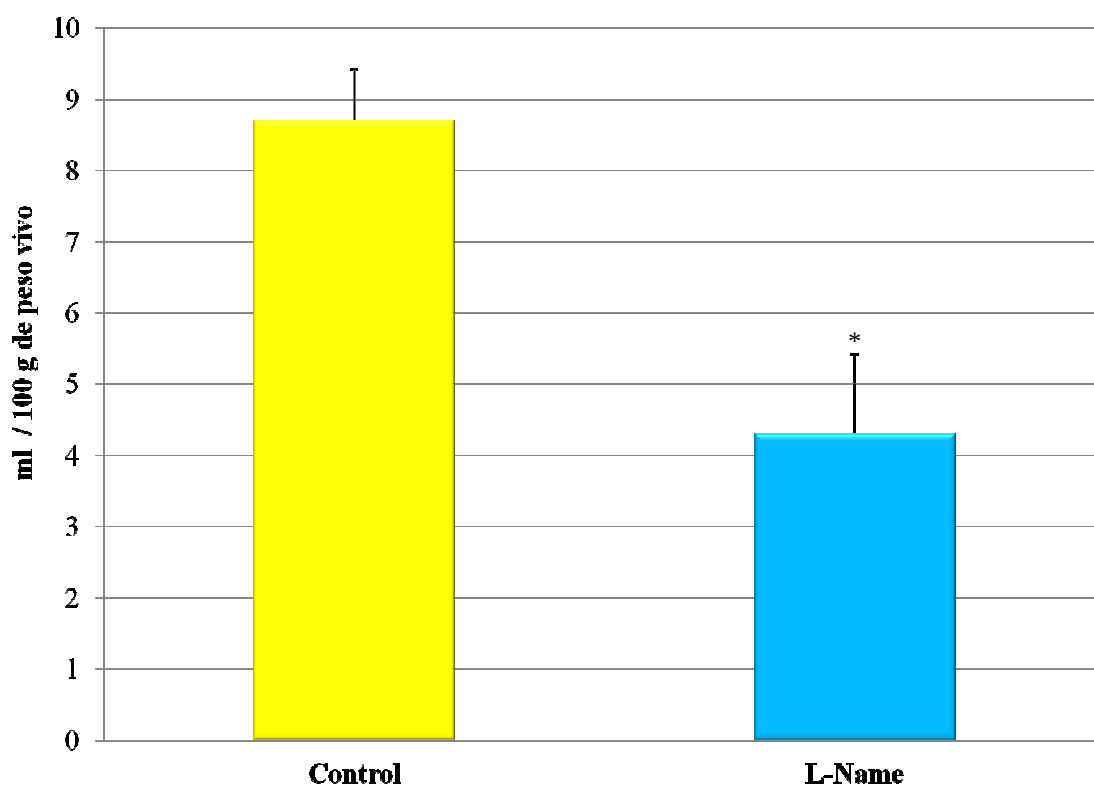
En las Gráficas 17 y 18 se muestran, respectivamente, los valores medios de ingesta de bebida y diuresis para los dos grupos estudiados. Observamos un valor medio inferior estadísticamente significativo de diuresis para el grupo L-NAME, lo que también se traduce en un balance hídrico menor para este mismo grupo (Gráfica 19). Lógicamente, el aumento en la diuresis está directamente relacionado con los mayores valores de PA del grupo L-NAME (Benter et al., 2006), e indica que el aumento en la PA se debería al incremento de la resistencia periférica o del gasto cardiaco.



Gráfica 17. Valores medios $\pm$ error estándar de la ingesta de agua (expresados en ml por 100 gramos de peso vivo) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), al final de la fase experimental.



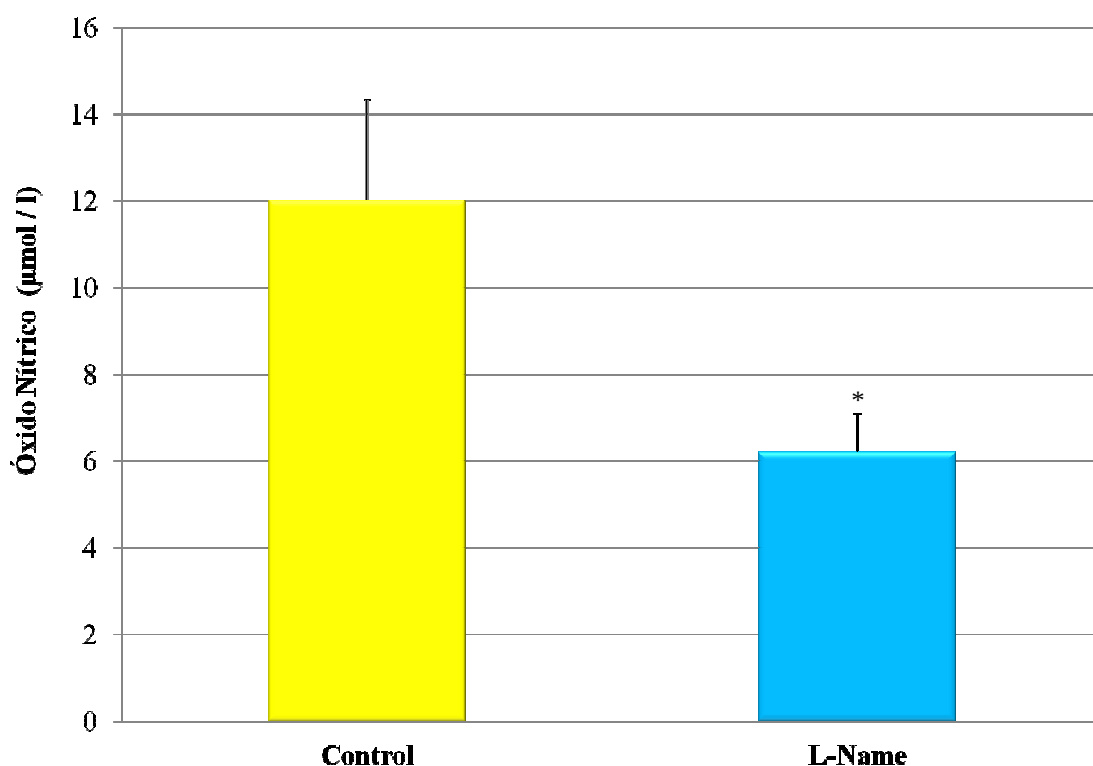
Gráfica 18. Valores medios $\pm$ error estándar de diuresis (expresados en ml de orina por 100 gramos de peso vivo y día) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), al final de la fase experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.



Gráfica 19. Valores medios $\pm$ error estándar del balance hídrico (expresados en ml por 100 gramos de peso vivo) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), al final de la fase experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.

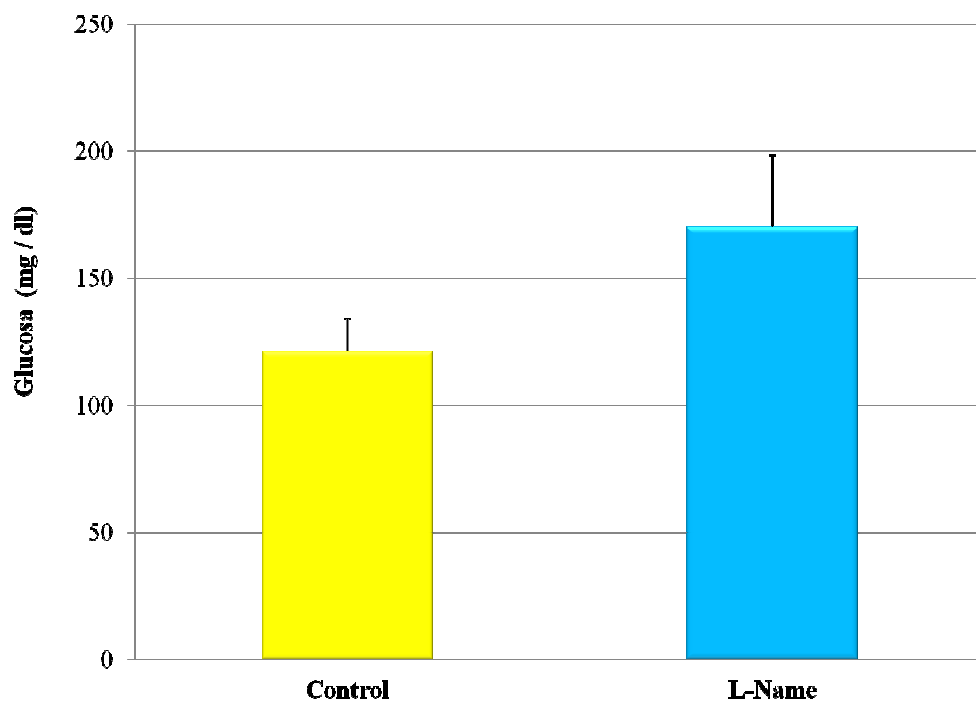
Parámetros sanguíneos: valores de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracciones de colesterol en plasma.

Tal y como cabía esperar, los niveles de óxido nítrico en plasma fueron estadísticamente inferiores en el grupo L-NAME (Gráfica 20).

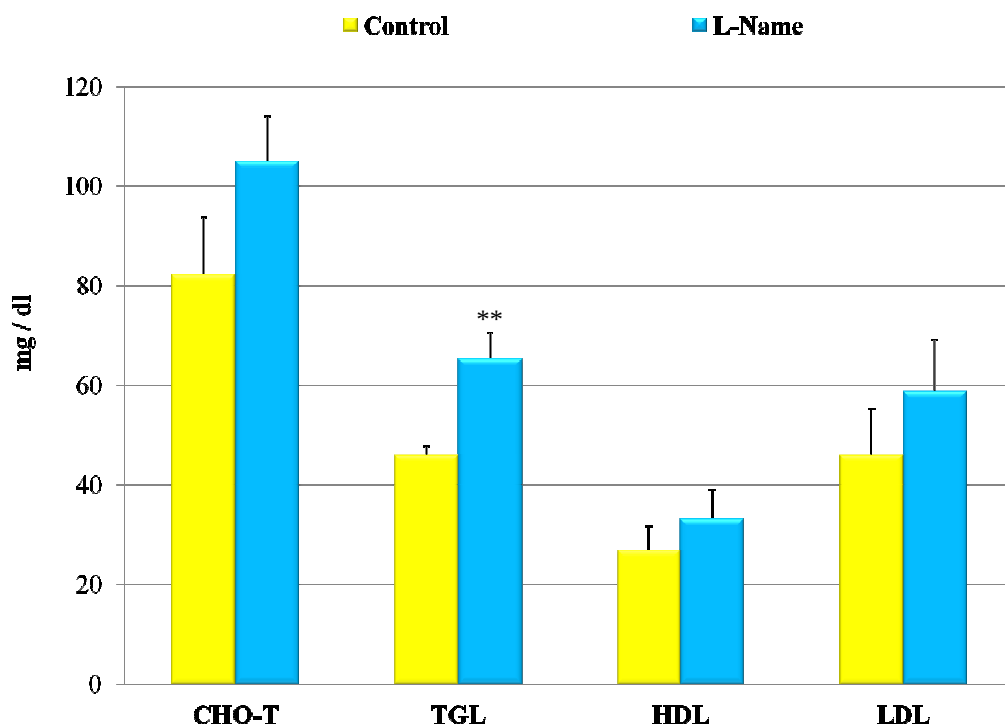


Gráfica 20. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de óxido nítrico en plasma para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como $\mu\text{mol/l}$. Se representan las diferencias estadísticamente significativas; * $p < 0,05$.

Las diferencias en los valores de glucemia basal no alcanzaron niveles estadísticamente significativos, aunque el valor medio fue superior para el grupo L-NAME (Gráfica 21), resultados que coinciden con los obtenidos recientemente por Benter et al. (2011), lo mismo que ocurrió con los valores referidos al perfil lipídico en sangre (Gráfica 22), donde sólo se obtuvo significación estadística para los niveles de triglicéridos (Benter et al., 2011), aumento que contrasta con resultados obtenidos anteriormente (Navarro et al., 1994).



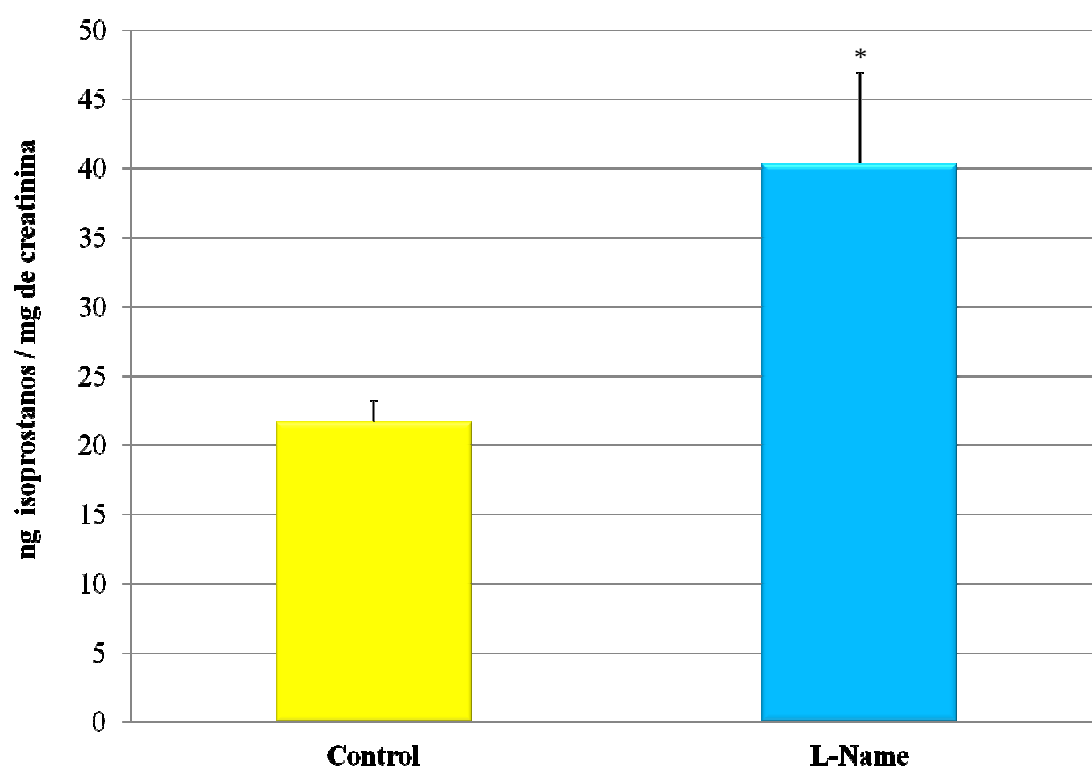
Gráfica 21. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de glucemia basal en plasma para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como mg/dl.



Gráfica 22. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de triglicéridos y colesterol total en sangre, así como las fracciones de colesterol HDL y LDL (expresados en miligramos por decilitro) para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$.

Niveles de estrés oxidativo

En la Gráfica 23 aparecen los valores medios de concentración de 8-isoprostanos en orina. La diferencia estadísticamente significativa, con una media superior en casi 20 ng en la orina de los animales del grupo L-NAME, indicaría unos valores muy superiores de estrés oxidativo en estos animales, lo que coincide con lo observado por Oudot et al., (2009).



Gráfica 23. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de 8-isoprostanos en orina para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como ng de isoprostanos por mg de creatinina. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.

5.1.3. EFECTO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA SUPLEMENTADA CON ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Evolución de los valores de Presión Arterial Sistólica

Para el estudio del efecto de la dieta suplementada con aceite de oliva virgen extra, teniendo en cuenta que los tratamientos dietéticos tienen un carácter fundamentalmente preventivo, se inició la administración de las dietas y el registro de los valores de PA desde las 4 semanas de vida de los animales, antes de que la hipertensión se hubiese desarrollado. Con el objeto de hacer un seguimiento exhaustivo del desarrollo de la hipertensión en los dos grupos de animales, se tomaron valores de PA semanalmente durante el primer mes, y cada 15 días durante el segundo.

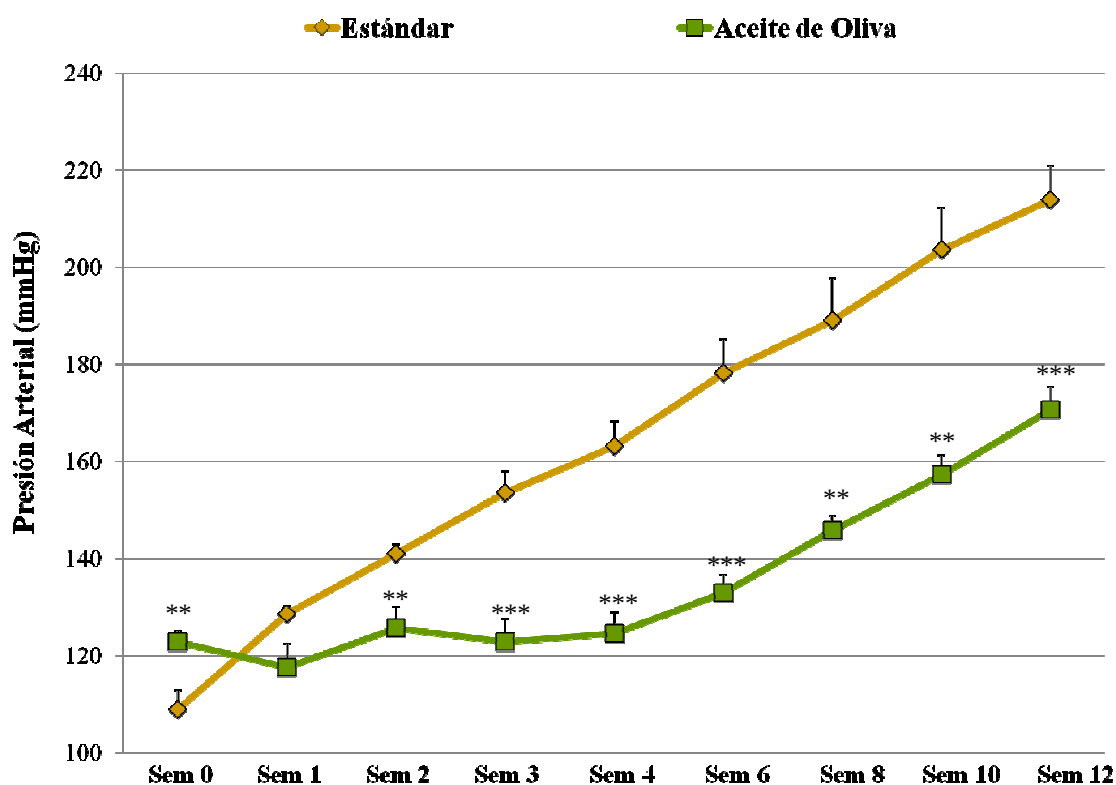
En la Gráfica 24 se representan los valores medios de PA, observándose como ya a las 2 semanas de iniciarse la administración de la dieta se observan valores de PA significativamente inferiores para el Grupo Aceite de Oliva virgen Extra frente al Estándar. Estas diferencias se mantienen y acentúan a lo largo de todo el periodo experimental.

A las 4 semanas, momento en el que se inició el tratamiento farmacológico de los otros grupos, los valores de PA del Grupo Aceite de Oliva Virgen Extra se situaban en los $124,5 \pm 4,39$ mmHg frente a los $163,1 \pm 5,15$ mmHg del grupo Estándar. A las 8 semanas, los valores de PA del Grupo Aceite de Oliva Virgen Extra alcanzaban los $145,8 \pm 2,93$ mmHg, mientras que los del grupo Captopril eran de $159,4 \pm 5,28$ mmHg. Sin embargo, en las semanas 10 y 12 se mantuvo el aumento de la PA alcanzándose los $170,6 \pm 4,72$ mmHg en el momento del sacrificio.

De los factores ambientales que afectan a la presión arterial (dieta, inactividad física, toxinas y factores psicosociales), los factores dietéticos tienen un destacado papel en la homeostasis de la PA (Alonso et al., 2006). La hipertensión puede ser reducida con una alimentación mediterránea, rica en frutas, verduras, cereales y vino; y cuyo principal aporte en grasas esté constituido por el aceite de oliva virgen extra, lo cual además se asocia con una baja incidencia de enfermedad cardiovascular (Covas, 2007).

Resultados de los estudios epidemiológicos y ensayos de alimentación indican que el aceite de oliva virgen extra (con una elevada proporción de ácidos grasos

monoinsaturados, y un alto contenido en compuestos fenólicos) podría tener efectos beneficiosos que eviten la aparición de hipertensión. Una alta ingesta de ácidos grasos monoinsaturados, sobre todo el ácido oleico, así como un alto consumo de oleuropeína se han asociado con un menor riesgo de hipertensión arterial (Alonso et al., 2006).



Gráfica 24. Valores medios $\pm$ error estándar de Presión Arterial Sistólica (expresados en mmHg) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Entre los componentes del aceite de oliva virgen extra con interés para la salud se encuentran el ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado que constituye el 55-83% del total de ácidos grasos del aceite de oliva. Los ácidos grasos saturados se encuentran en una menor proporción (8-14%) así como los ácidos grasos poliinsaturados (4-20%). Además, en la composición del aceite de oliva virgen extra encontramos otros componentes con función antioxidante, como la vitamina E y los polifenoles. Se cree que los efectos benéficos se deben tanto a la composición en ácidos grasos como a los componentes minoritarios, fundamentalmente los que cuentan con carácter antioxidante (Owen et al., 2000; Bermudez et al., 2011).

El patrón de alimentación denominado “Dieta Mediterránea” se asocia con una incidencia significativamente menor de enfermedades cardiovasculares en comparación a otras zonas europeas no mediterraneas. Este efecto se ha relacionado con determinados hábitos de alimentación (Martínez-González y Sánchez-Villegas, 2004) que están vinculados a una menor incidencia de alteraciones cardiovasculares, como el perfil lipídico (Zambón et al., 2000), los valores de presión arterial (Psaltopoulou et al., 2005), la función endotelial (Fuentes et al., 2001), así como los niveles de estrés oxidativo (Owen et al, 2000).

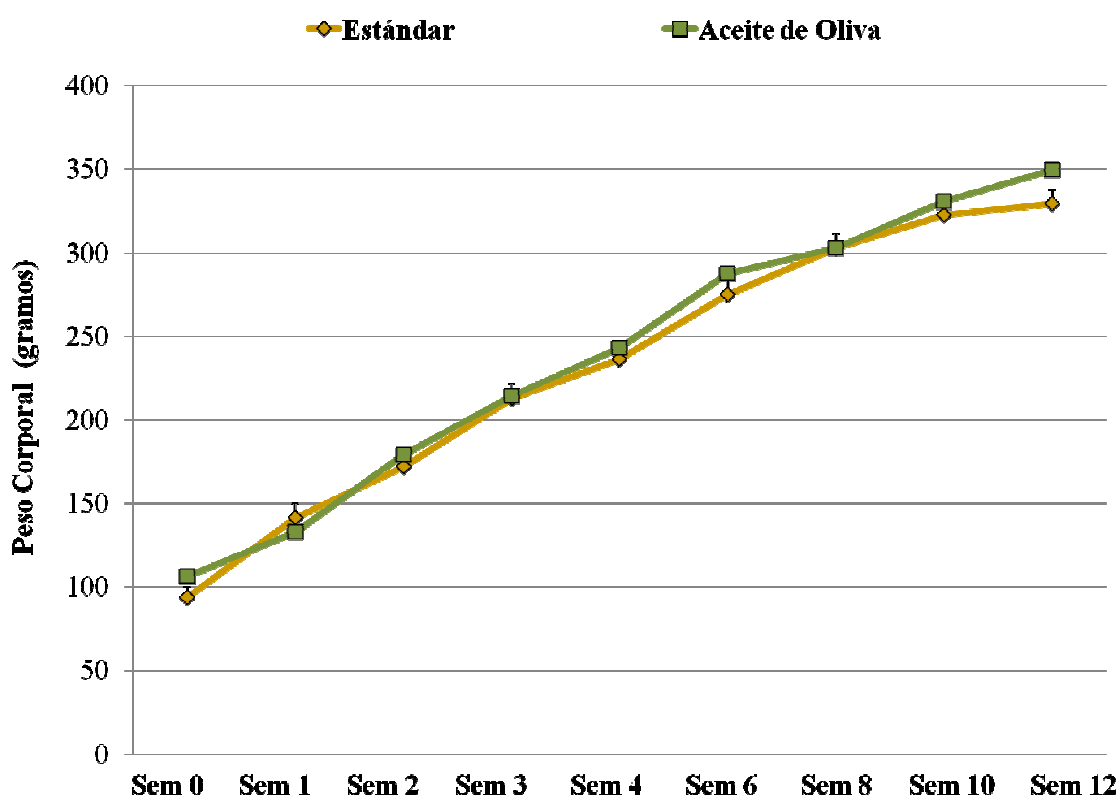
Como ya hemos indicado, uno de los principales componentes de la Dieta Mediterránea es el aceite de oliva virgen extra, caracterizado por su alto contenido en ácido oleico (70-80%), así como por la presencia de numerosos compuestos bioactivos en su fracción minoritaria. Numerosos estudios apoyan el efecto reductor sobre la presión arterial de la ingesta a largo plazo de aceite de oliva virgen extra , y su papel preventivo sobre el desarrollo de hipertensión (Ruiz-Gutiérrez et al., 1996; Estruch et al., 2006). Numerosos son también los estudios que han tratado de esclarecer los mecanismos que a nivel molecular median el efecto del aceite de oliva virgen extra sobre la presión arterial, por ejemplo, a través de la cascada de segundos mensajeros asociados a la proteína G (Alemany et al., 2007).

Muchos de los trabajos realizados se han dirigido al establecimiento del papel cardioprotector de los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen extra, sobretudo el α -tocoferol y los polifenoles (Rodríguez-Rodríguez et al., 2007), o al papel que ejerce el ácido oleico sobre los valores de presión arterial (Terés et al., 2008).

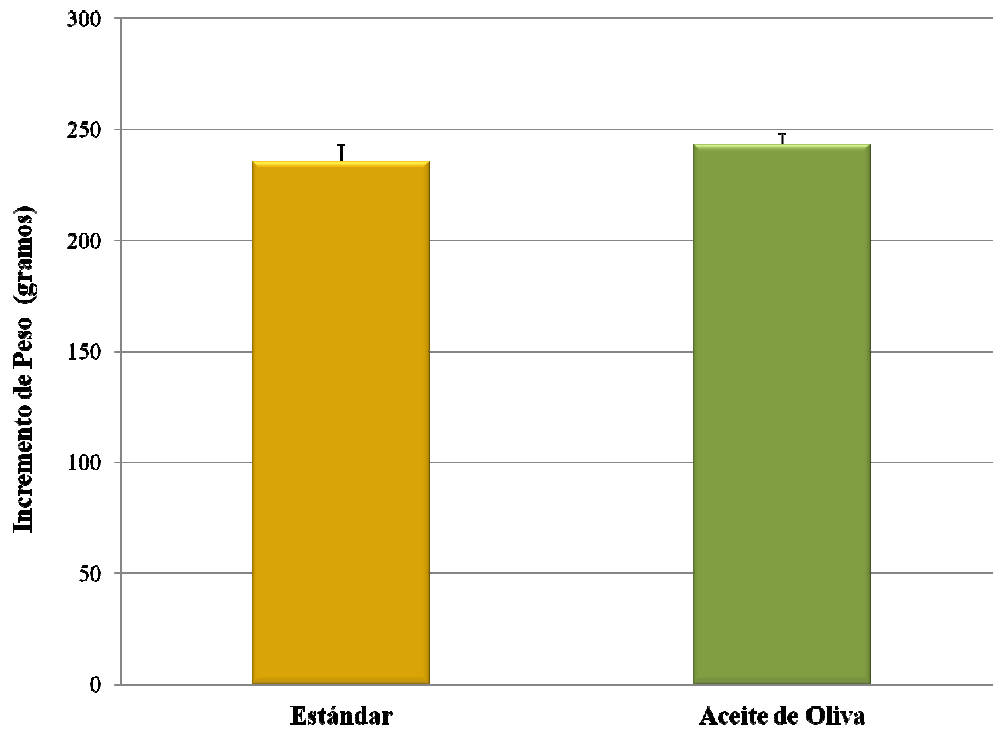
Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran como la ingesta de una dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra, aunque no evita que se establezca la hipertensión en animales SHR, sí que retrasa la aparición de la misma, ya que en los animales controles valores medios superiores a 140 mmHg se alcanzaron en la tercera semana experimental (séptima semana de vida de los animales), mientras que en el grupo que recibió la dieta con aceite de oliva virgen extra valores similares sólo se alcanzaron en la octava semana experimental (Villarejo et al., 2012). Estos resultados también apoyan la influencia del tipo de grasa dietética sobre los mecanismos de regulación de la PA (Segarra et al., 2008).

Evolución del peso corporal e ingesta de alimento

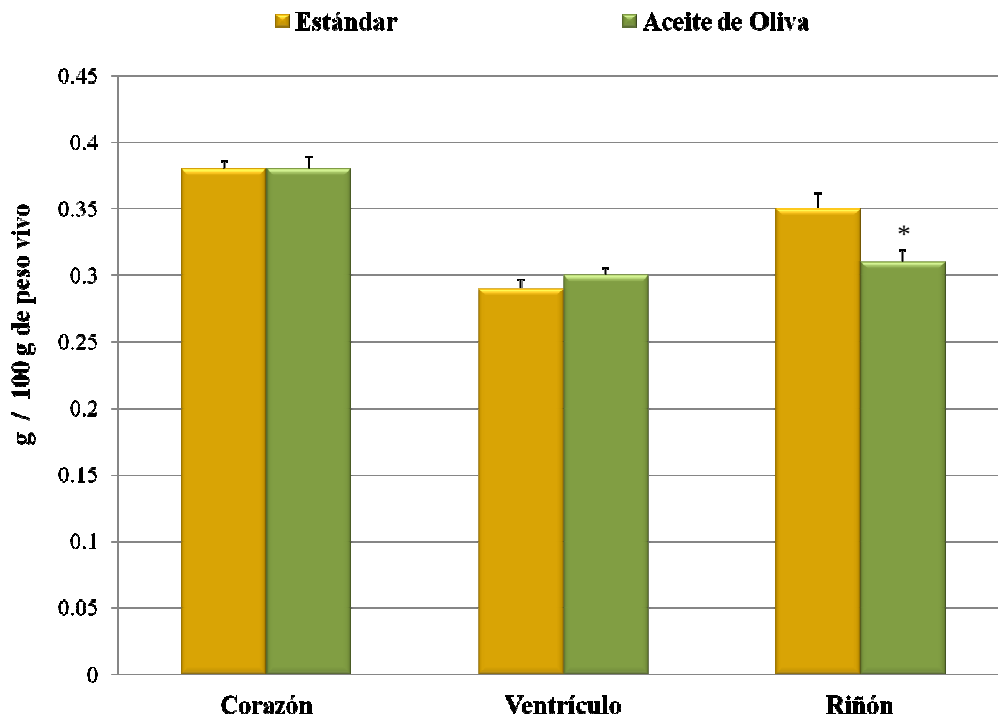
No se observaron diferencias en los valores de peso corporal entre los dos grupos a lo largo de todo el proceso experimental (Gráfica 25), ni por lo tanto en la ganancia neta de peso al final del mismo (Gráfica 26), ni en los valores porcentuales del corazón. Sin embargo, si se observó un valor relativamente menor en el peso de los riñones del Grupo Aceite de Oliva Virgen Extra (Gráfica 27).



Gráfica 25. Valores medios $\pm$ error estándar de peso corporal (expresados en gramos) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental.

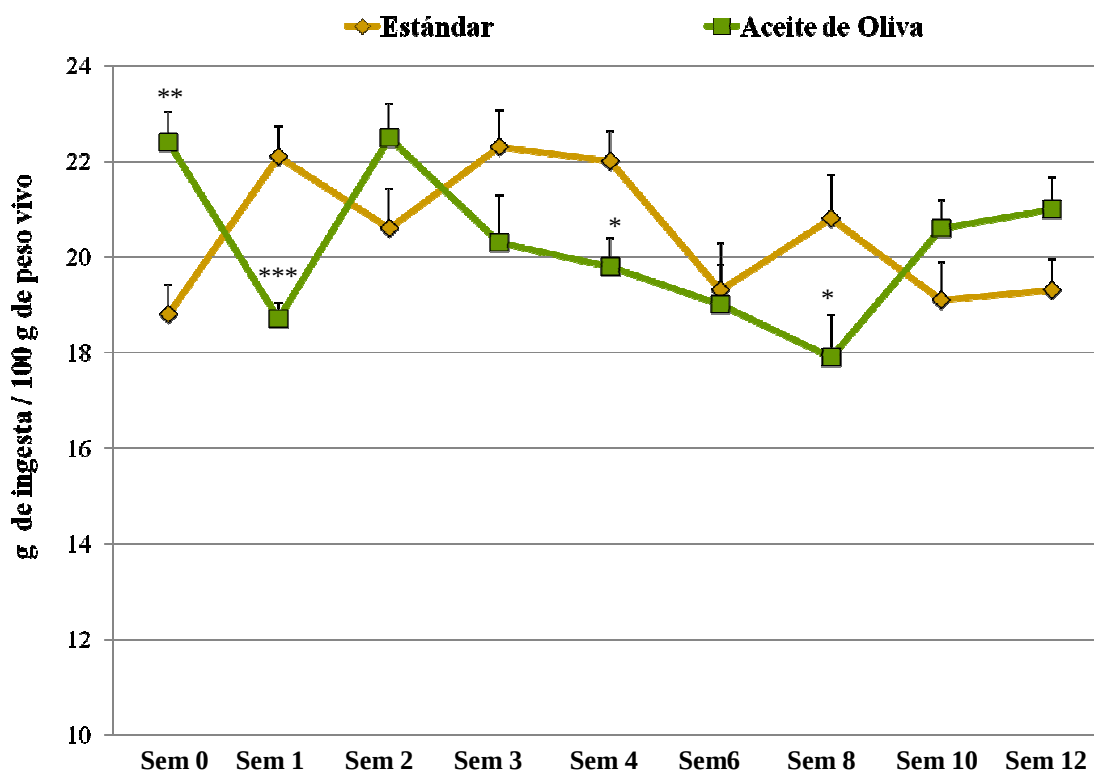


Gráfica 26. Valores medios $\pm$ error estándar del incremento de peso (expresados en gramos) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) durante todo el periodo experimental.



Gráfica 27. Valores medios $\pm$ error estándar del peso del corazón, el ventrículo izquierdo y el riñón (expresados en gramos por 100g de peso vivo) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) al final del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.

Por otro lado, a la similitud en las tasas de crecimiento de los dos grupos de animales se le une la falta clara de diferencias en la ingesta diarias de alimento (Gráfica 28) a lo largo de todo el periodo experimental, incluso teniendo en cuenta que la dieta suplementada con Aceite de Oliva Virgen Extra era hipercalórica, si bien, en determinados momentos la ingesta del grupo Aceite de Oliva Virgen Extra fue estadísticamente inferior a la del grupo Estándar (semanas 1, 4 y 8).



Gráfica 28. Valores medios $\pm$ error estándar de la ingesta de alimento (expresados en gramos por día y por 100 g de peso vivo) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Las dietas altas en grasa se utilizan habitualmente en estudios con roedores para establecer su efecto sobre variables fisiológicas y metabólicas relacionadas con el síndrome metabólico y patologías asociadas como la hipertensión, la obesidad, la diabetes tipo 2 o las enfermedades cardiovasculares, sin que en la mayoría de las ocasiones se tenga en cuenta la fuente lipídica de dichas dietas (Buettner et al., 2007).

Uno de los objetivos del presente estudio fue comprobar cómo la inclusión de cantidades relativamente elevadas de aceite de oliva virgen extra (20%) en la dieta de

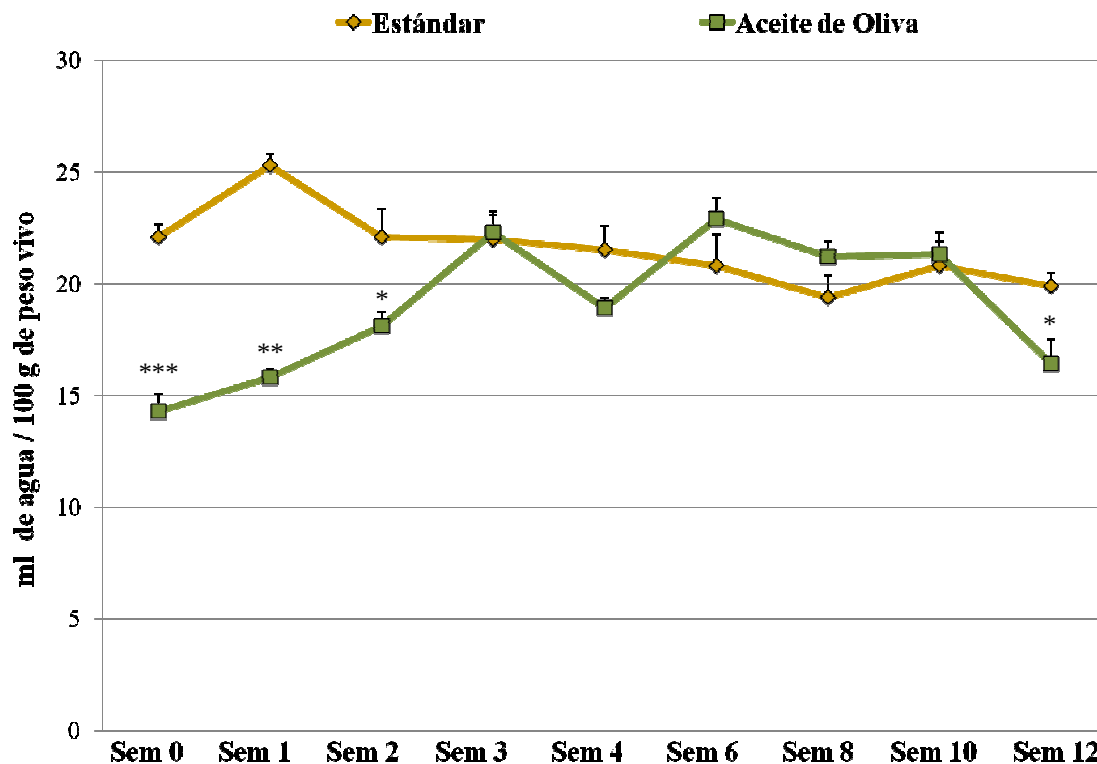
animales de experimentación podía condicionar la evolución del peso corporal a lo largo del tiempo, en comparación con una dieta con un bajo contenido en grasa (estándar).

En los estudios realizados para evaluar el efecto de las dietas altas en grasa sobre el incremento de peso corporal en estirpes de ratas normotensas, los resultados son hasta el momento contradictorios. Lo mismo ocurre con el modelo SHR. En comparación con otras estirpes, las ratas SHR son resistentes al aumento de peso inducido por dietas altas en grasa, y cuando se producen cambios, los efectos son mucho menos pronunciados que en las ratas normotensas (Zhang et al., 1994; Sedová et al., 2004; Segarra et al., 2011). Sin embargo, otros autores describen incrementos en el peso corporal y en la adiposidad en ratas SHR alimentadas con dietas altas en grasa durante periodos cortos de tiempo (8-12 semanas). Probablemente estas diferencias se deban a cambios en la composición de la dieta utilizada, que normalmente en dichos estudios es rica en ácidos grasos saturados.

Nuestros datos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de peso corporal a lo largo de todo el periodo experimental, a pesar de que la ingesta de alimento, expresada en Kj/100 g PV si que fue superior para el grupo que consumió la dieta enriquecida con aceite de oliva. Estos resultados concuerdan con otros obtenidos anteriormente, donde el tratamiento con una dieta alta en grasa (ácidos grasos poliinsaturados) inducía una mayor ingesta energética en ratas SHR, sin que dicho aumento se refleje en aumentos ni del peso corporal ni de la adiposidad (Oliveira et al., 2009), y probablemente estén relacionados con el perfil lipídico incorporado a la dieta. Los resultados obtenidos en nuestro estudio estarían de acuerdo con el conocido efecto beneficioso de aceite de oliva en el control del balance energético y el peso corporal (Soriguer et al., 2007) y con la estimulación que la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados produciría sobre los procesos de lipólisis (Soriguer et al., 2003).

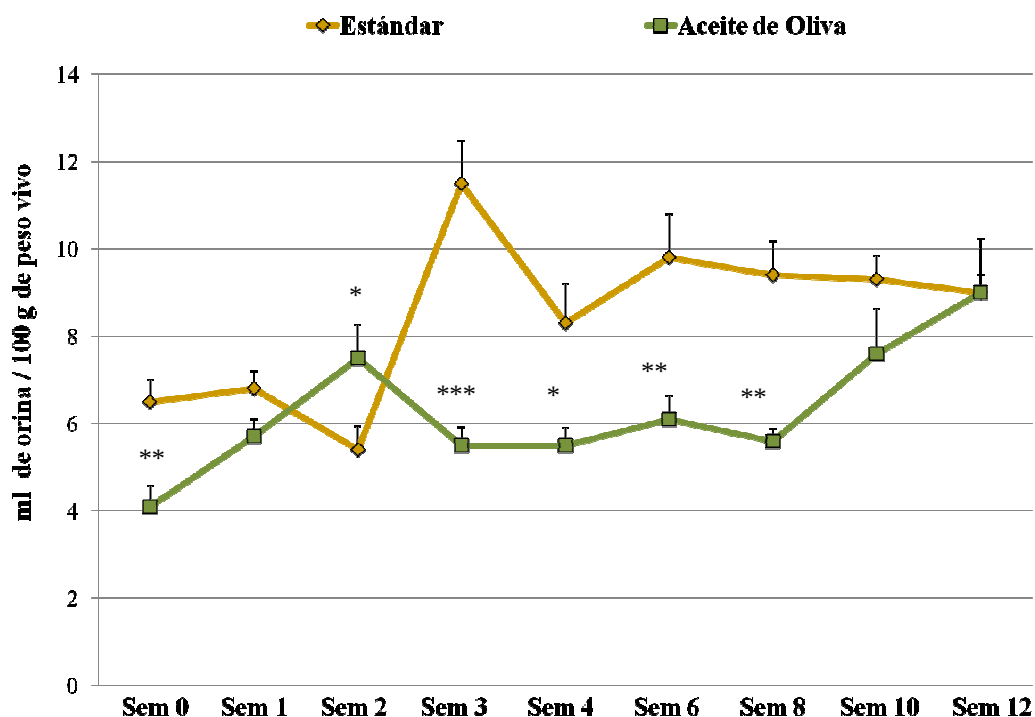
Ingesta de bebida, diuresis y balance hídrico

En la evolución de la ingesta de bebida podríamos distinguir tres periodos: desde el inicio del experimento hasta la tercera semana, la ingesta fue inferior en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra, a partir de la cuarta semana no se alcanzan diferencias entre ambos grupos, estableciéndose de nuevo valores inferiores para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra al final de experimento (Gráfica 29).

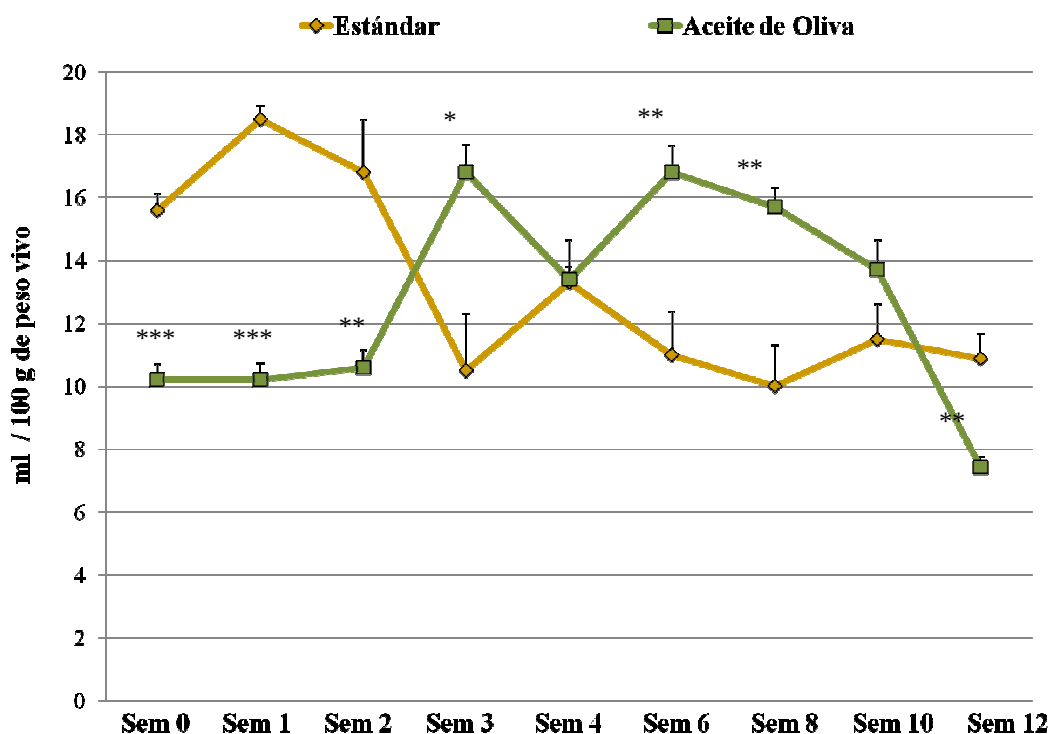


Gráfica 29. Valores medios $\pm$ error estándar de la ingesta de agua (expresados en ml por día) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En cambio, el perfil de la diuresis es muy distinto (Gráfica 30), ya que prácticamente durante todo el periodo experimental los valores fueron menores para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra, exceptuando las dos últimas semanas donde ya no se alcanzan diferencias. Estos cambios también se van a ver reflejados en el balance hídrico (Gráfica 31).



Gráfica 30. Valores medios $\pm$ el error estándar de la diuresis (expresados en ml excretados por día y por 100 g de peso vivo) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

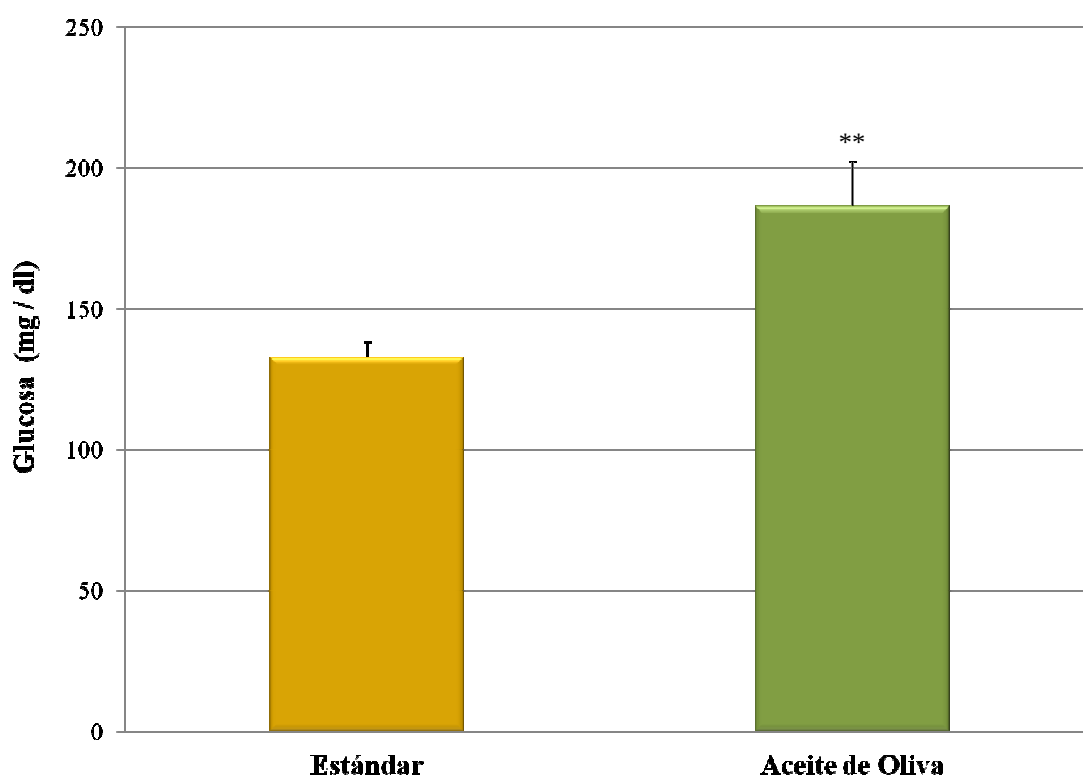


Gráfica 31. Valores medios $\pm$ error estándar del balance hídrico (expresados en mililitros por día y por 100 g de peso vivo) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8) a lo largo del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas entre grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Resulta interesante destacar que a partir de la semana 8, coincidiendo con un aumento en los valores de PA por encima de los 150 mmH, se observa un aumento de la diuresis y una disminución del balance hídrico, y que el mantenimiento de unos menores niveles de PA en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra no irían asociados a un aumento en la diuresis, como ocurrió en los animales tratados con Captopril (Villarejo et al, 2012).

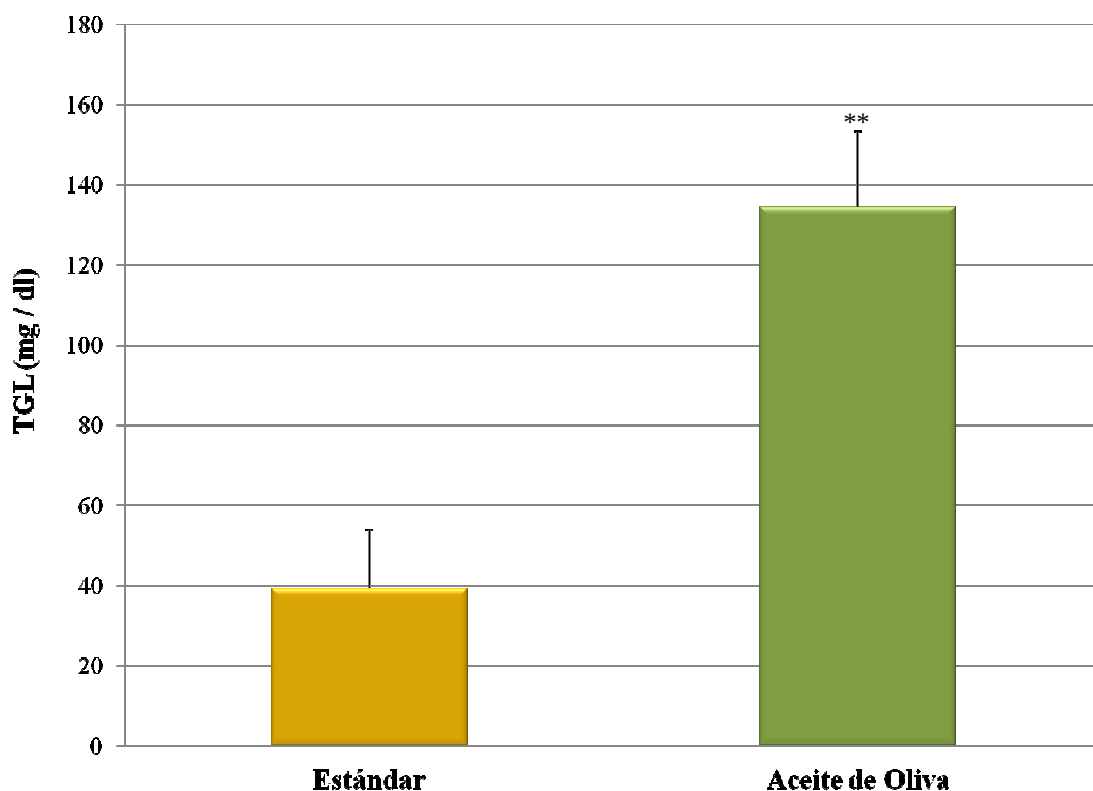
Parámetros sanguíneos: valores de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracciones de colesterol en plasma

En la Gráfica 32 se representan los valores de glucemia en ayunas, observándose valores medios estadísticamente superiores para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con sus controles.

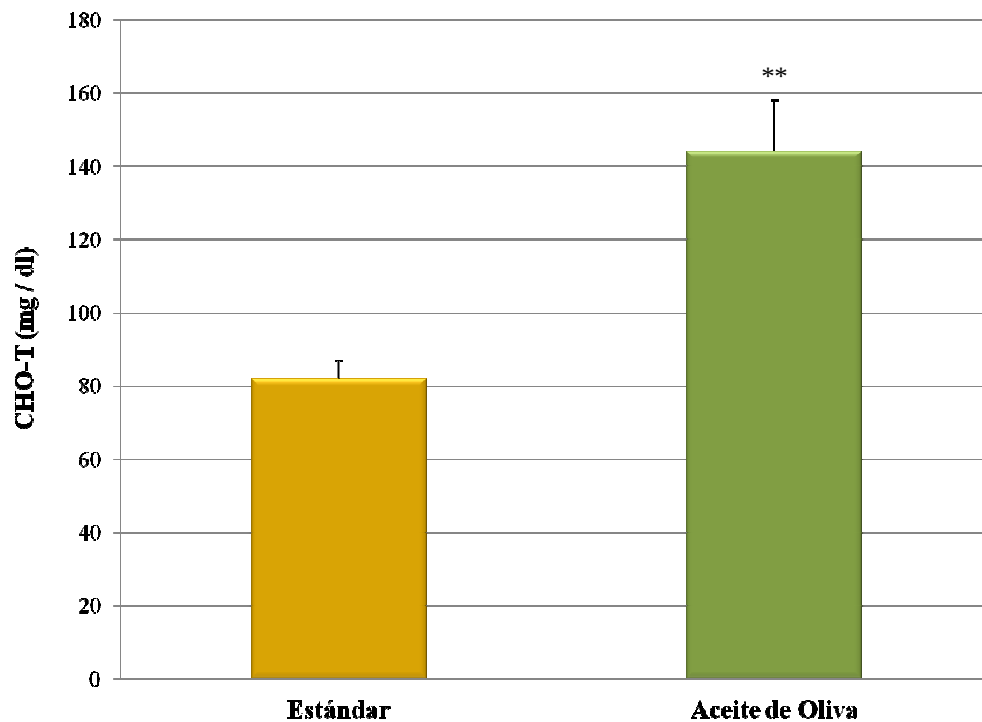


Gráfica 32. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de glucosa basal en plasma para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como mg/dl. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: ** $p < 0,01$.

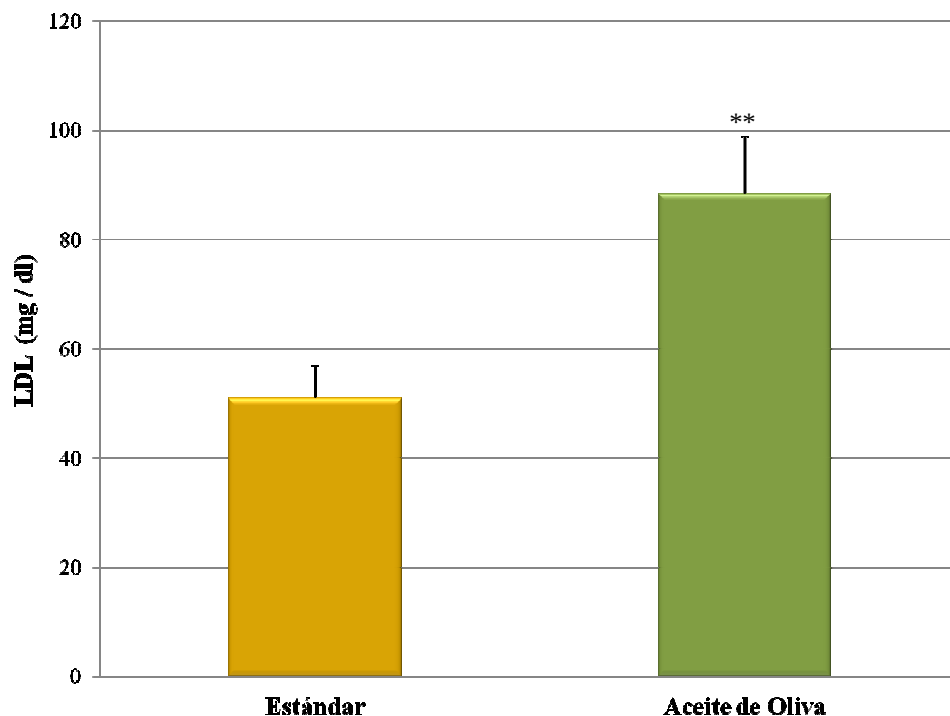
En las Gráficas 33, 34, 35, 36 y 37 se muestran las medias correspondientes al perfil lipídico. Como cabría esperar, teniendo en cuenta que se ha comparado una dieta estándar con otra alta en grasa, los valores medios de concentración plasmática de triglicéridos, colesterol total y LDL fueron superiores para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra (Ruiz-Gutiérrez et al., 2001; Segarra et al., 2008).



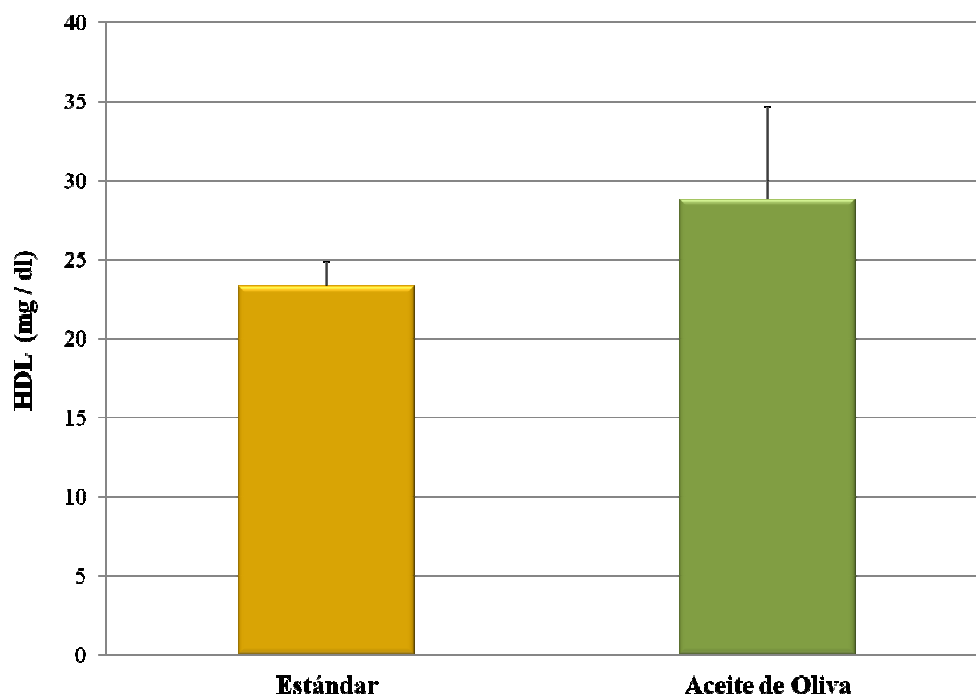
Gráfica 33. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de triglicéridos en sangre (expresados en miligramos por decilitro) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** p<0,01.



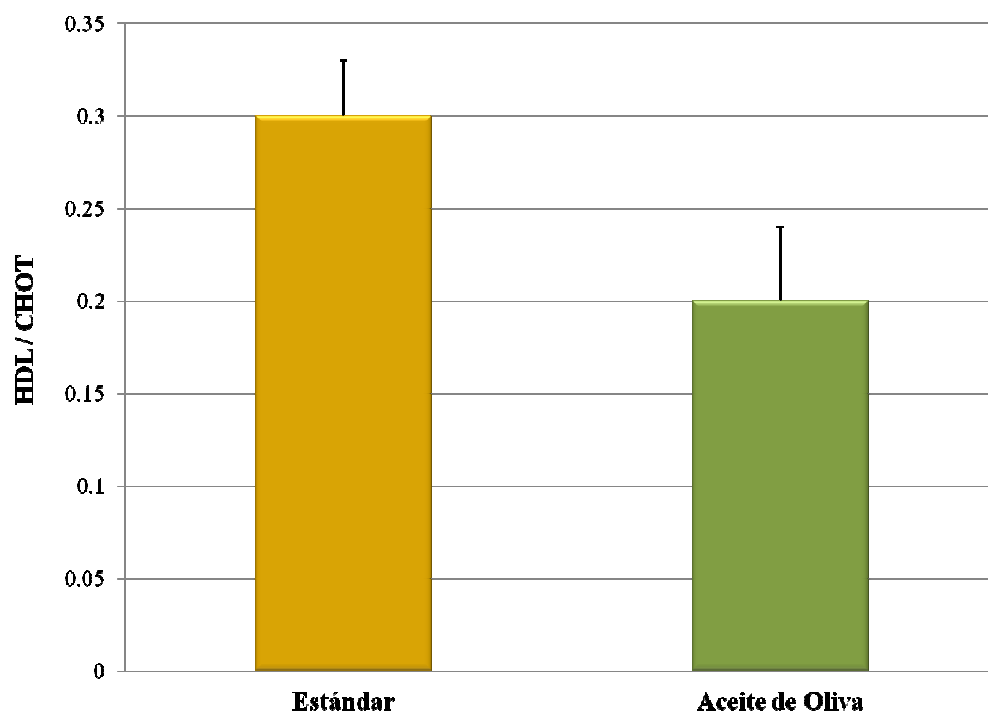
Gráfica 34. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de colesterol total en sangre (expresados en miligramos por decilitro) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas: **p<0,001.



Gráfica 35. Valores medios $\pm$ el error estándar de las concentraciones de LDL colesterol en sangre (expresados en miligramos por decilitro) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** p<0,01.



Gráfica 36. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de concentración de HDL colesterol en sangre (expresados en miligramos por decilitro) para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8).



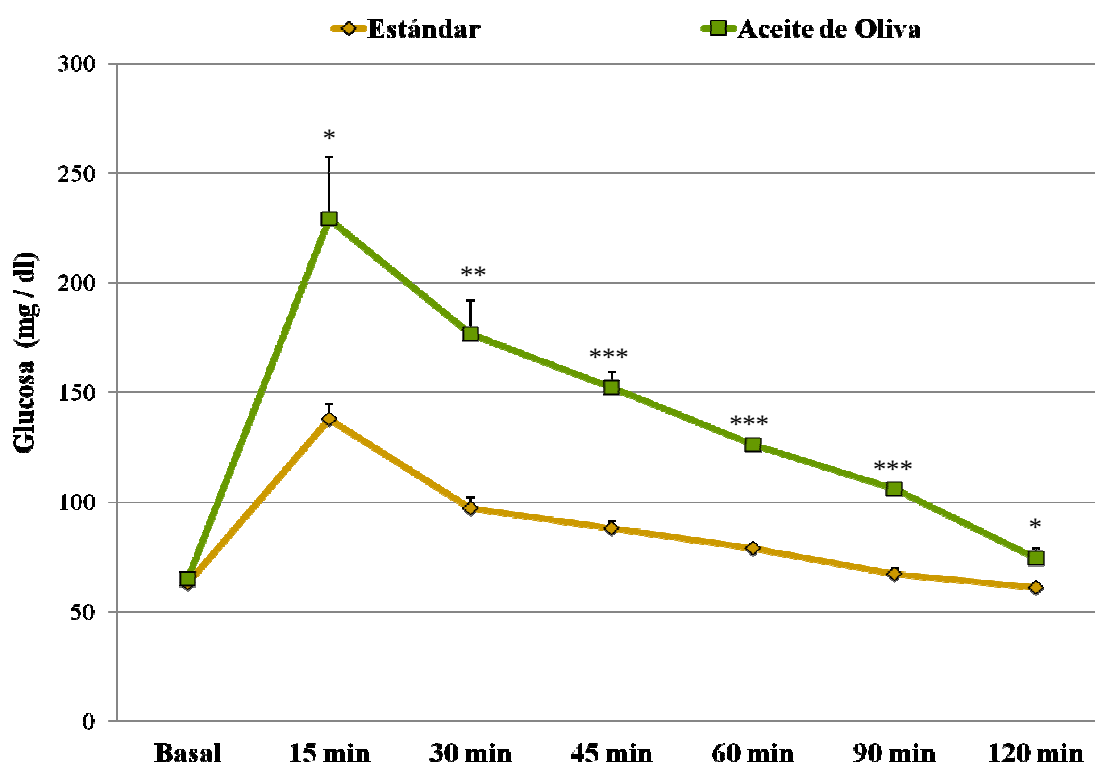
Gráfica 37. Valores medios $\pm$ error estándar de la relación HDL/colesterol total en sangre para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8).

Con el objeto de analizar con mayor profundidad los valores de glucemia basales, se procedió a realizar en los animales de cada grupo las correspondientes curvas de tolerancia a la glucosa. En la Gráfica 34 se muestra la evolución de la glucemia como respuesta a una sobrecarga intraperitoneal de glucosa en los dos grupos de animales. Por un lado, el pico de aumento de glucosa a los 15 min fue claramente superior para los animales que habían recibido la dieta enriquecida en Aceite de Oliva Virgen Extra, por otro, los valores de glucemia en dicho grupo tardaron más tiempo en alcanzar el nivel basal (Gráfica 38), lo que también se reflejó en unos valores claramente superiores de AUC (área bajo la curva) para el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra (Gráfica 39).

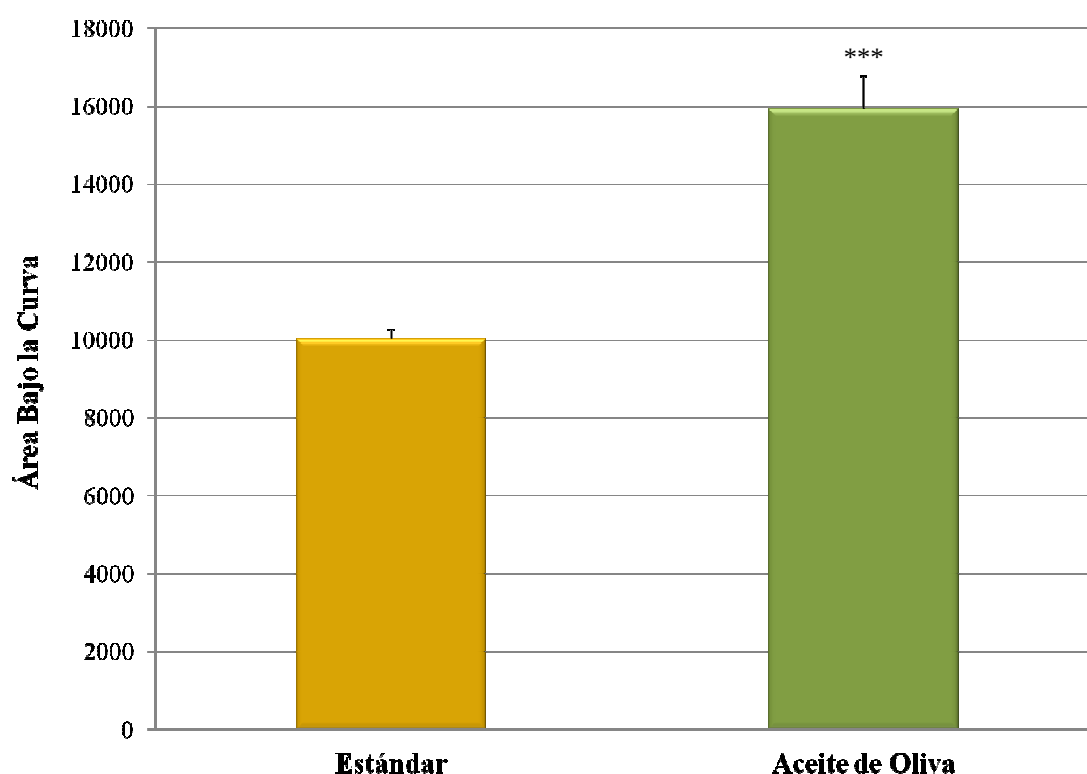
Desde hace tiempo sabemos que la grasa dietética está implicada en el desarrollo de diabetes y la resistencia a la insulina tanto en humanos como en distintos modelos de experimentación animal. Diversos estudios sugieren que altas concentraciones de grasa en la dieta se relacionan con la aparición de resistencia a la insulina, y los estudios clínicos indican que esta resistencia a la actuación de la insulina es independiente del desarrollo de obesidad. No obstante, los distintos tipos de grasa parecen tener efectos diferenciales sobre la insulina. Así, los ácidos grasos saturados y determinados tipos de ácidos grasos monoinsaturados parecen causar resistencia a la insulina, mientras que a los poliinsaturados, entre ellos los omega 3, se les ha atribuido un efecto protector frente a la diabetes tipo 2 (Lovejoy, 2002). Además del grado de saturación, la longitud de la cadena hidrocarbonada parece jugar un importante papel, de forma que mientras los triglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena larga promoverían la aparición de resistencia a la insulina, aquellos que presentan en su estructura ácidos grasos de cadena media son capaces de mejorar la respuesta a esta hormona, efecto que parece estar relacionado con un menor depósito de grasa mesentérica y unos mayores niveles de adiponectina circulante. Algunos autores han señalado que estos efectos de los distintos tipos de ácidos grasos sobre la insulina podrían estar mediados por modificaciones en la regulación de la actividad de enzimas lipogénicos y de las desaturasas (Risérus, 2007).

No todos los tipos de ácidos grasos con un efecto protector de la función cardiovascular parecen mejorar la respuesta a la insulina. Por ejemplo, hay estudios que demuestran que la suplementación con ácido linoleico conjugado disminuye la sensibilidad a la insulina en humanos obesos y en pacientes con diabetes tipo 2 (Moloney et al., 2004). En el caso concreto del aceite de oliva, desde hace tiempo los resultados de distintos estudios han demostrado un efecto positivo de este tipo de grasa

sobre la respuesta a la insulina tanto en humanos (Tierney y Roche, 2007; Teng et al., 2011) como en modelos animales (Prieto et al., 2005); aunque los resultados obtenidos hasta el momento parecen no ser concluyentes (Cancelas et al., 2006; Prieto et al., 2007; Teng et al., 2011). Los resultados presentados en esta Tesis parecen no apoyar un efecto beneficioso sobre el metabolismo glucídico, si bien debemos tener en cuenta que los valores obtenidos se están comparando con los de un modelo animal que no parece haber desarrollado resistencia a la insulina y que fue alimentado con una dieta estándar, cuando la mayoría de los estudios utilizan modelos de obesidad o diabetes tipo 2, y comparan los efectos del aceite de oliva virgen extra frente a otras grasas, generalmente saturadas (Tierney y Roche, 2007). Por otro lado, la vía de administración de la glucosa también podría ser determinante, ya que los efectos beneficiosos de aceite de oliva virgen extra sobre la homeostasis de la glucosa se han relacionado con un aumento de la liberación intestinal de GLP-1 (Rocca et al, 2001; Prieto et al., 2005), efecto que no tendría lugar cuando la vía de administración es intraperitoneal.



Gráfica 38. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de glucosa en sangre (expresados en mg/dl) tras una sobrecarga intraperitoneal de glucosa, para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas entre grupos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Gráfica 39. Valores medios $\pm$ error estándar del área bajo la curva para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8). Se representan las diferencias estadísticamente significativas: *** $p < 0,001$.

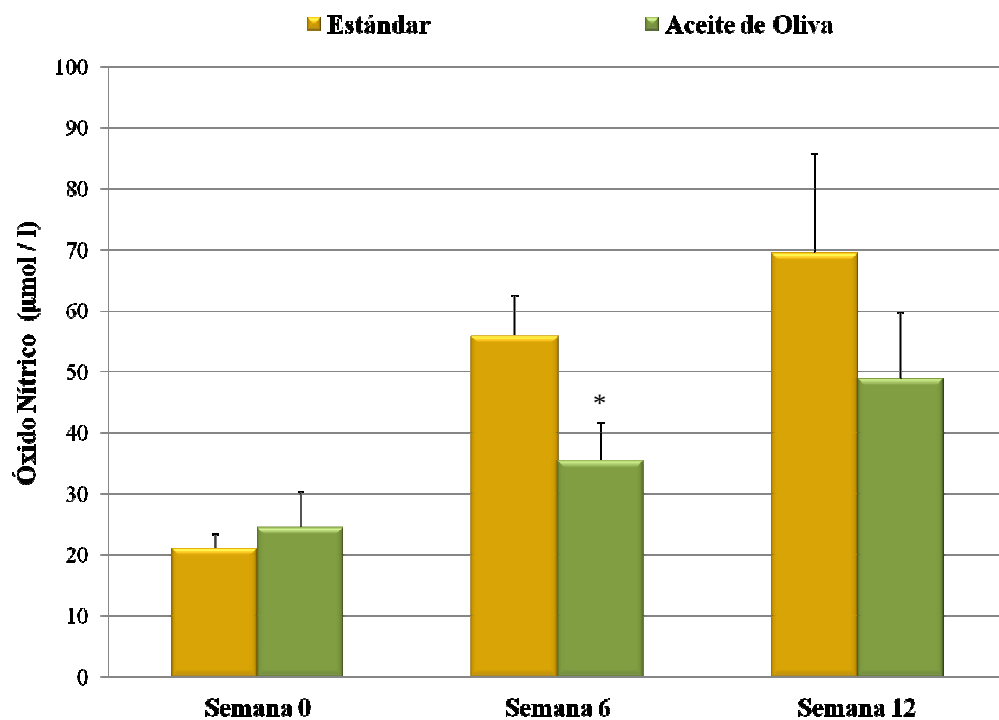
Por último, en la Gráfica 40 se representan los valores de concentración de óxido nítrico en orina al comienzo del proceso experimental y a las 6 y 12 semanas de tratamiento dietético, donde aparecen niveles menores de concentración en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra, aunque significación estadística solo se obtiene para la sexta semana. Estas variaciones no se observan en la determinación de la concentración de óxido nítrico en plasma en el momento del sacrificio (Gráfica 41).

El papel del aceite de olive como un ingrediente activo frente a la producción de NO fue estudiado por Herrera et al. (2001), quienes administraron a grupos de ratas hipertensas aceite de oliva o aceite de girasol alto oleico, comprobando que sólo el aceite de oliva virgen lograba mejorar la función vascular y producir vasodilatación. Estos resultados sugirieron que factores independientes al contenido en ácidos grasos monoinsaturados eran responsables del efecto vasodilatador del aceite de oliva virgen extra.

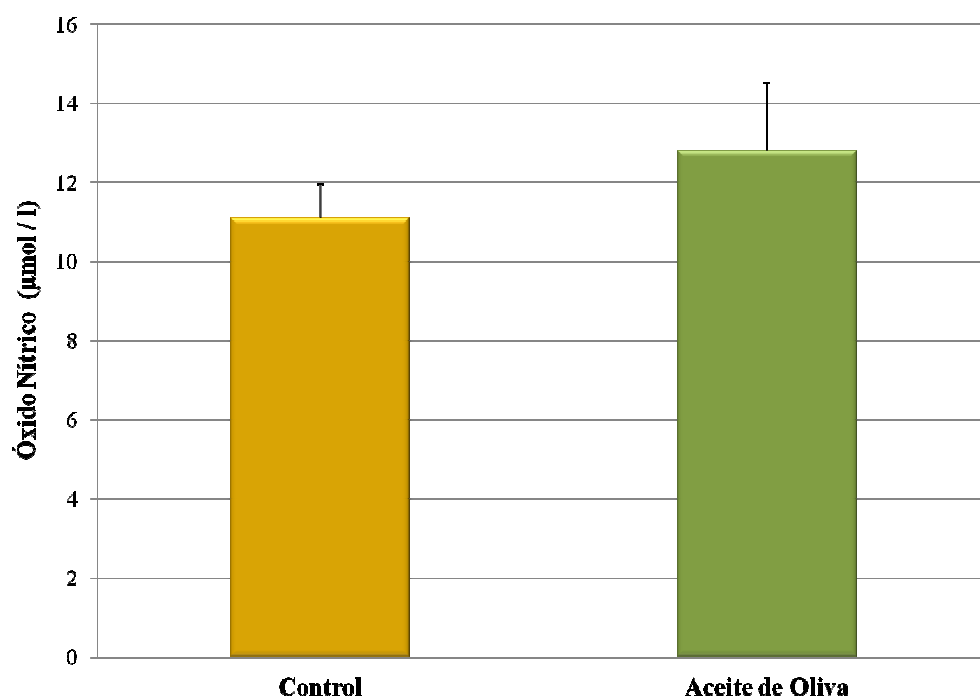
Posteriormente, Ruano et al. (2005) investigaron el efecto de distintos tipos de aceites de oliva según su contenido en polifenoles, sobre la función vascular en pacientes hipercolesterolémicos, concluyendo que el efecto vasodilatador tenía lugar sólo cuando los pacientes consumían aceite de oliva virgen extra. Entre los distintos componentes fenólicos del aceite de oliva virgen extra, especial atención se ha prestado al hidroxitirosol debido a su capacidad como antioxidante. Sin embargo, este polifenol parece no intervenir en la modulación de la expresión de la NOS, al menos en cultivos de células endoteliales (Schmitt et al., 2007).

Si que se ha descrito una mejora en la reactividad vascular en ratas SHR mediada por un incremento en la expresión de la NOS endotelial y en los niveles de NO, en estudios in vitro (Rodríguez-Rodríguez, 2006) o en ratas alimentadas con aceite de orujo de oliva (Rodríguez-Rodríguez et al., 2007). Este efecto se ha relacionado con la alta concentración en compuestos triterpénicos del aceite de orujo, que actuarían modulando la actividad NOSe.

En nuestro estudio no observamos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de NO en plasma al final del periodo experimental. En las muestras de orina, la media de las concentraciones de nitratos y nitritos fueron inferiores en el grupo de aceite de oliva virgen extra con respecto a los animales que recibieron la dieta estándar, diferencia que llegó a alcanzar significación estadística en el segundo periodo de balance (sexta semana experimental), cuando los valores de PAS no habían superado aún los 140 mmHg. Distintos estudios han descrito un aumento en los niveles de NO y la expresión de NOS en distintos tejidos de las ratas SHR (Fernández et al., 2000; de Gasparo et al., 2002; Isabelle et al., 2012) como respuesta al incremento en los valores de PAS, lo que explicaría las menores concentraciones de NO en el grupo alimentado con aceite de oliva virgen extra, donde los valores de PAS fueron también menores. Por otro lado, recientemente se ha descrito un efecto estimulante de los niveles de estrés oxidativo sobre la expresión de NOS en el riñón de ratas SHR (Cao et al., 2011), lo podría explicar la menor producción de NO en el grupo aceite de oliva virgen extra, donde los valores de estrés oxidativo también fueron inferiores.



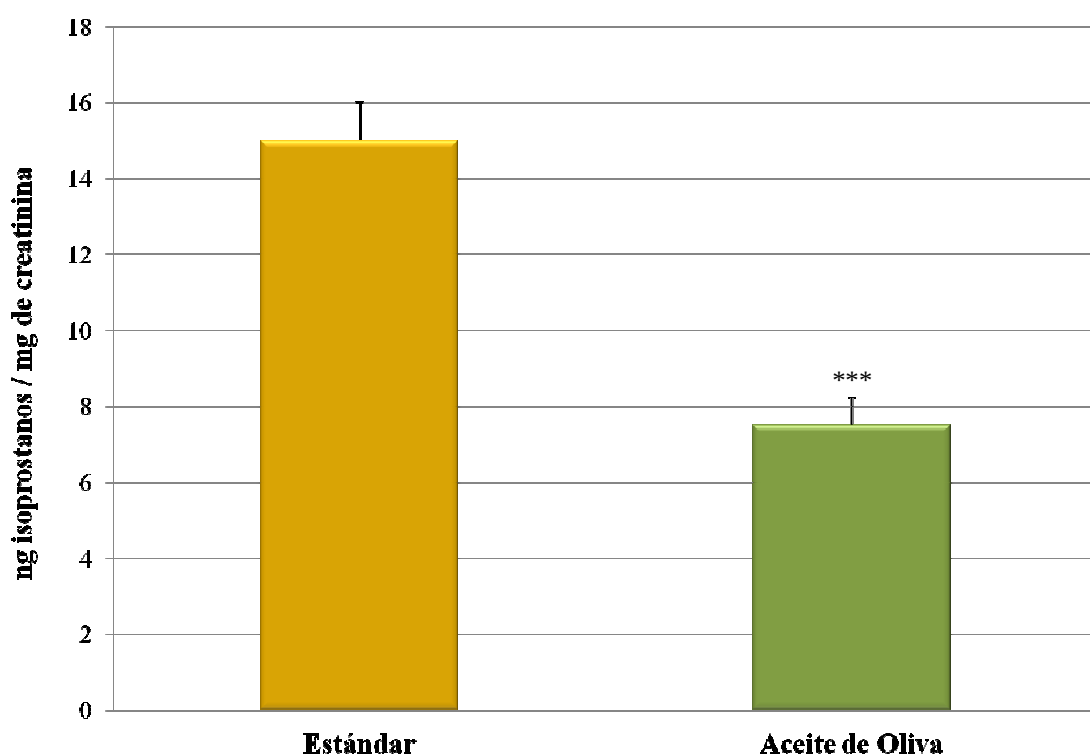
Gráfica 40. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de óxido nítrico en orina (expresados en $\mu\text{mol/l}$) los grupos Estándar ($n=8$) y Aceite de Oliva Virgen Extra ($n=8$), en la etapa inicial, intermedia y final del periodo experimental. Se representan las diferencias estadísticamente significativas entre grupos: * $p < 0,05$.



Gráfica 41. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de óxido nítrico en plasma para los grupos Estándar ($n=8$) y Aceite de Oliva Virgen Extra ($n=8$), expresados $\mu\text{mol/l}$.

Niveles de estrés oxidativo

La determinación de la concentración de 8-isoprostanos en orina al final del periodo experimental indica unos niveles mucho menores de estrés oxidativo en los animales que habían recibido la dieta suplementada con Aceite de Oliva Virgen Extra en comparación con el grupo Estándar (Gráfica 42). La disminución de los valores en orina de 8-isoprostanos asociada a dietas enriquecidas en aceite de oliva virgen extra ha sido descrita tanto en humanos (Visoli et al., 2000; Raederstorff, 2009), como en modelos de roedores (Acín et al., 2007), y se asocia al efecto sobre los niveles de estrés oxidativo de distintos componentes de la facción minoritaria de estos aceites, como el hidroxitirosol y la oleuropeína.

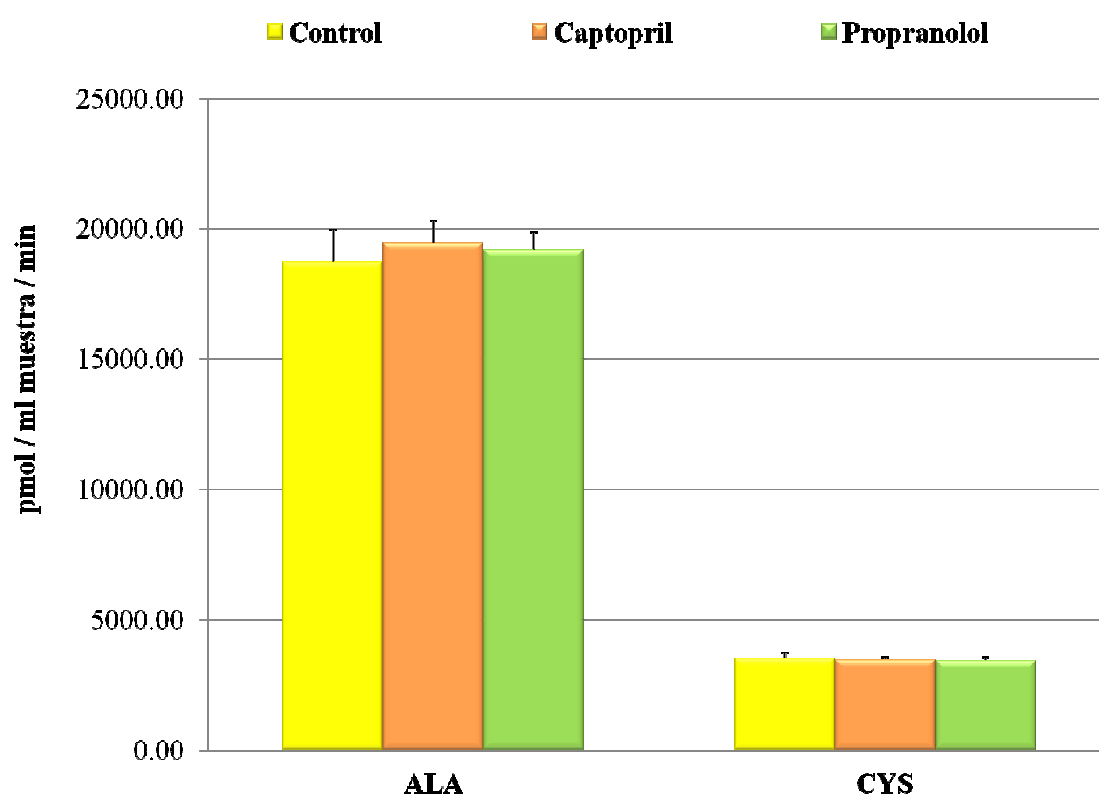


Gráfica 42. Valores medios $\pm$ error estándar de los niveles de 8-isoprostanos en orina para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como ng de isoprostanos por mg de creatinina. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: *** p<0,001.

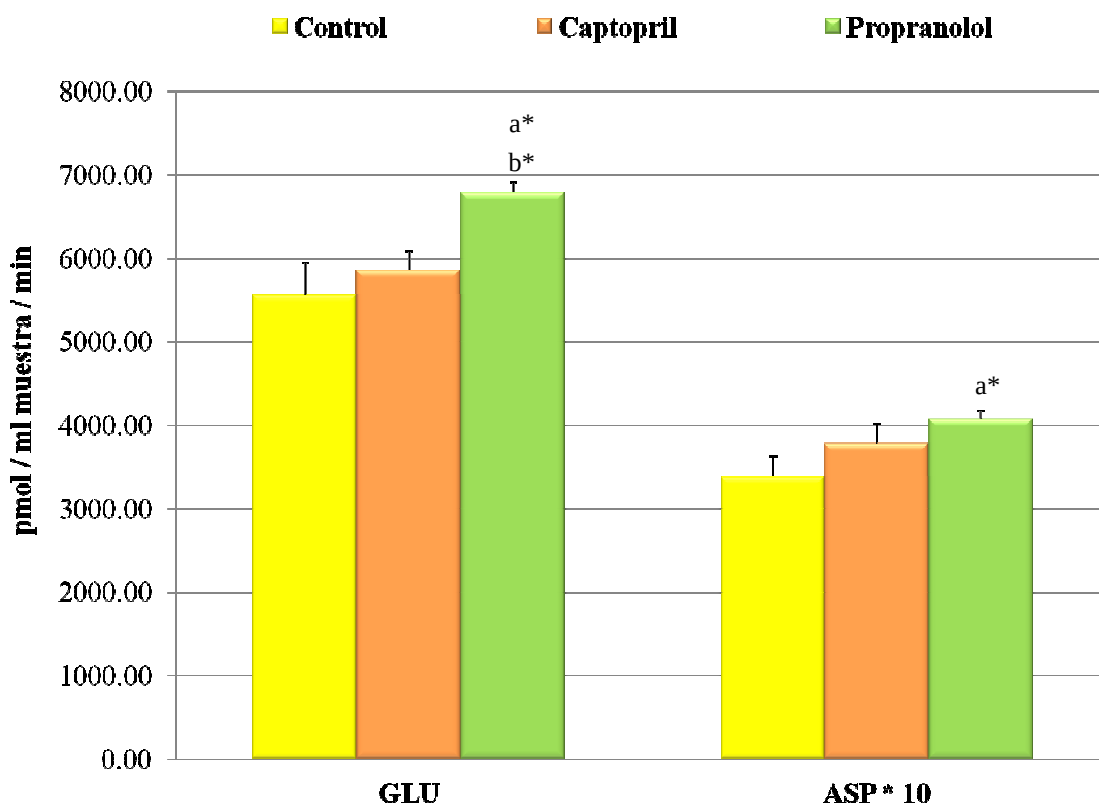
5.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS ESTUDIADAS.

5.2.1. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO.

En las gráficas 43 y 44 se muestran los valores de actividades aminopeptidasas (AlaAP, CysAP, GluAP y AspAP) en plasma para los grupos Control, Captopril y Propranolol.



Gráfica 43. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades plasmáticas Alanina (ALA) y Cisteína (CYS) Aminopeptidasas para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/ml muestra/min.



Gráfica 44. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades plasmáticas de Glutámico (GLU) y Aspártico (ASP) Aminopeptidasa, expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/ml muestra/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; * $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con captopril, a pesar de tratarse de un fármaco inhibidor del ECA y de disminuir significativamente los niveles de presión arterial, no afecta a la actividad de estos enzimas plasmáticos. Estos resultados difieren de los obtenidos tras el tratamiento con captopril en los animales normotensos, donde si se detectó un aumento en las actividades AlaAP y CysAP y una disminución en la actividad AspAP (Villarejo et al., 2012).

El SRA plasmático parece jugar un importante papel en el desarrollo de la hipertensión en la cepa SHR, y los inhibidores del ECA, al igual que los bloqueantes del receptor AT1 actúan eficazmente en el control del desarrollo de la hipertensión (Healy y Song, 1999), sin que, sin embargo, exista una correlación directa entre las disminución de los valores de presión arterial y una menor concentración de distintos componentes del SRA, como la Ang II, el angiotensinógeno o la renina. De hecho, anteriores estudios demostraron un papel más predominante a nivel renal de la Ang II y otros péptidos del SRA, en comparación con el SRA sistémico (Rettig et al, 1993). Aunque los valores de

actividad APA (GluAP) son superiores en los animales SHR que en sus controles normotensos, el tratamiento con captopril no afecta significativamente a estos niveles de actividad (Healy y Song, 1999).

Resultados recientes (Nagata et al., 2012) han puesto de manifiesto que el tratamiento con un inhibidor del ECA (imidapril) o con un bloqueante de los receptores AT1 (losartan), provoca un aumento en los niveles de actividad de renina, así como en las concentraciones de Ang I y Ang II.

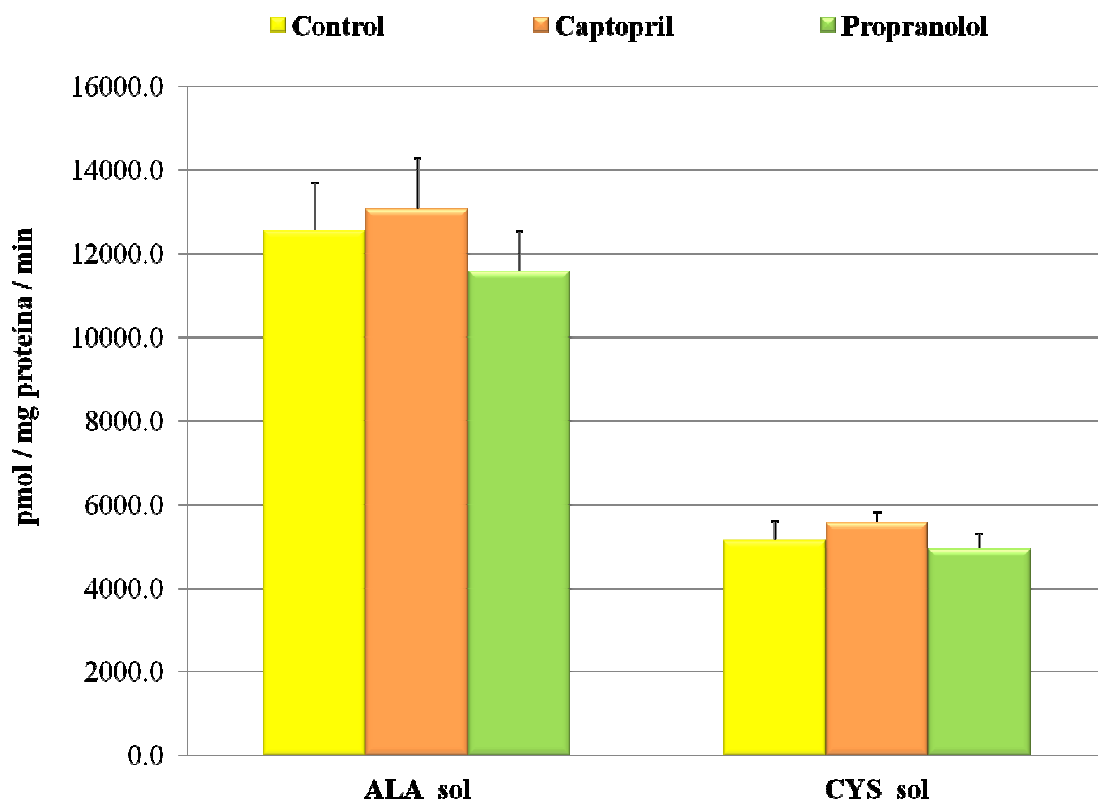
Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen indicar que el tratamiento con captopril, y los descensos en los valores de PA asociados a su administración en animales SHR, no parecen estar asociados a modificaciones en el metabolismo de las angiotensinas que forman parte del SRA plasmático.

Sin embargo, el propranolol si que provoca un aumento estadísticamente significativo en una de estas actividades: la actividad GluAP, y un incremento de la actividad AspAP, aunque en este caso no se alcance la significación estadística (Gráfica 44).

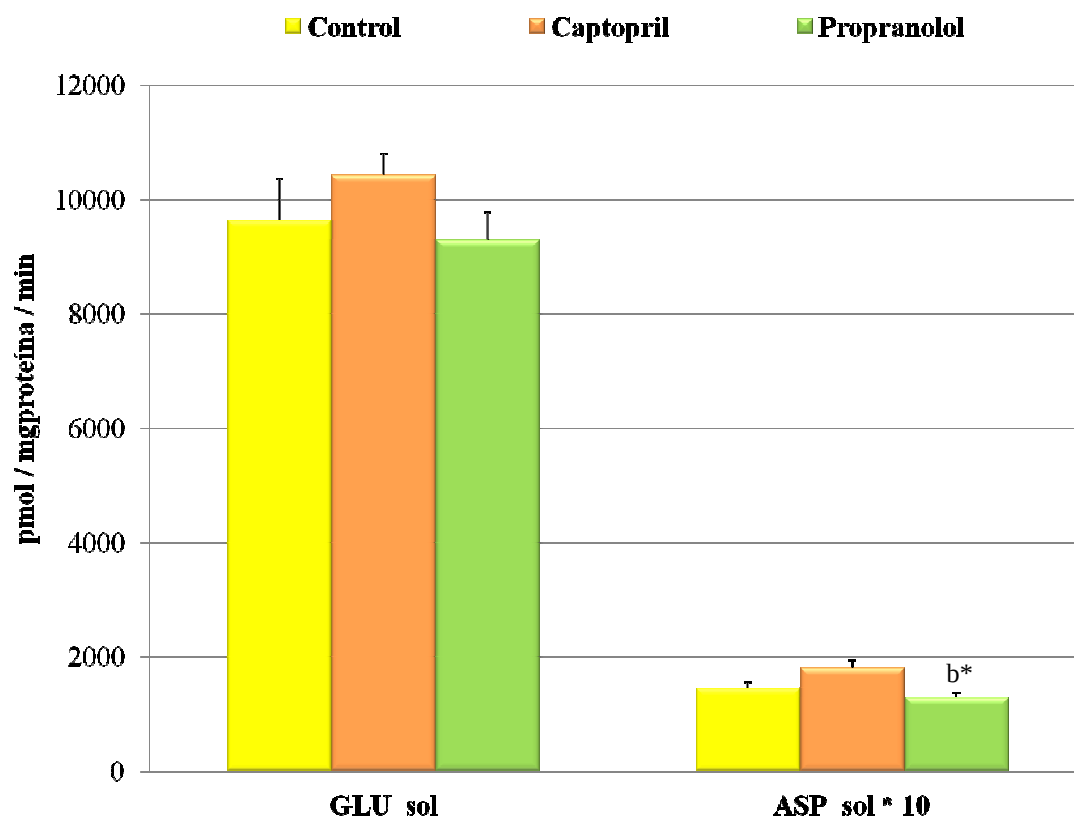
Este resultado es interesante, ya que numerosos estudios apuntan la posibilidad de que la presencia de las actividades aminopeptidasa en plasma esté relacionada con una activación del sistema nervioso simpático (SNS), el cual provocaría una mayor liberación de estas enzimas al plasma desde los tejidos periféricos. Nuestros resultados, sin embargo, demuestran que el bloqueo del SNS se traduce en un aumento de las actividades GluAP y AspAP en plasma. Este incremento podría relacionarse con un mayor metabolismo de la Ang II a Ang III y de la Ang I a Ang 2-10, péptidos que podrían actuar modulando los efectos fisiológicos de la Ang II. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, la interrelación entre el SNS y el SRA sistémico (Banegas et al., 2009).

5.2.2. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL.

En las gráficas 45 y 46 se muestran los valores de actividades aminopeptidasas solubles (AlaAP, CysAP, GluAP y AspAP) en el hipotálamo de los animales que recibieron el tratamiento con Captopril y Propranolol; mientras que en las gráficas 47 y 48 se presentan estos mismos valores de actividad para la fracción unida a membrana.

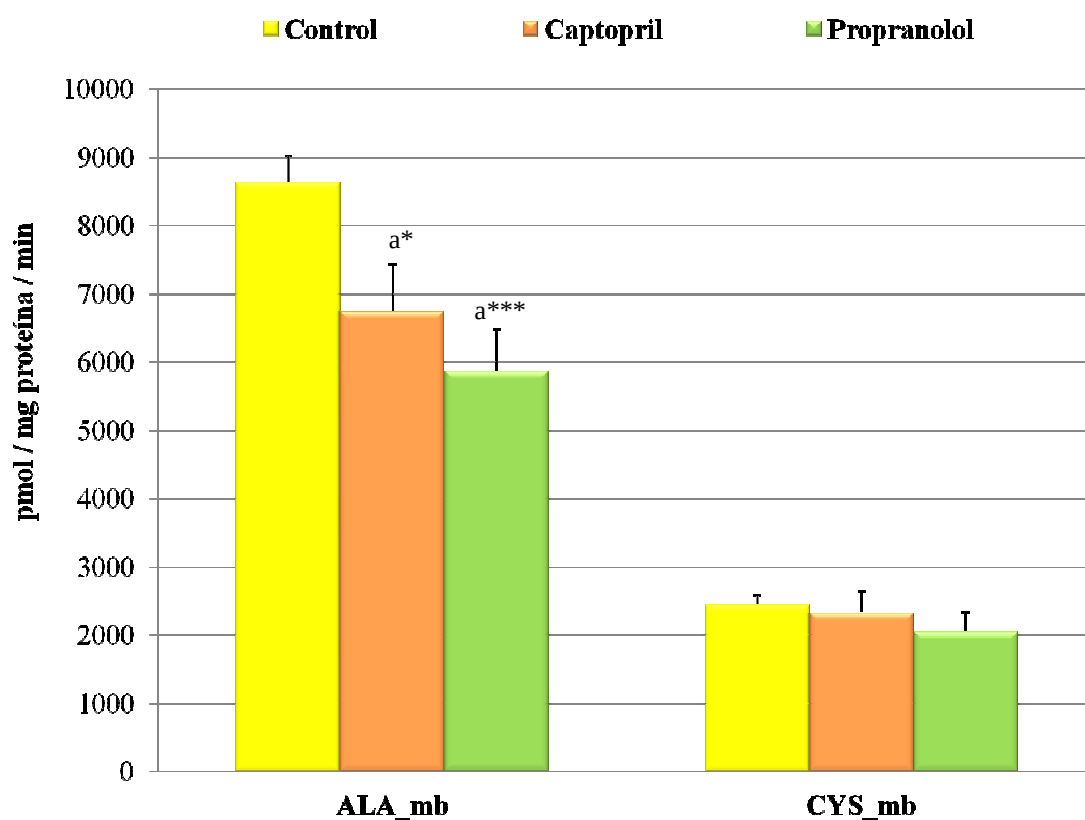


Gráfica 45. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



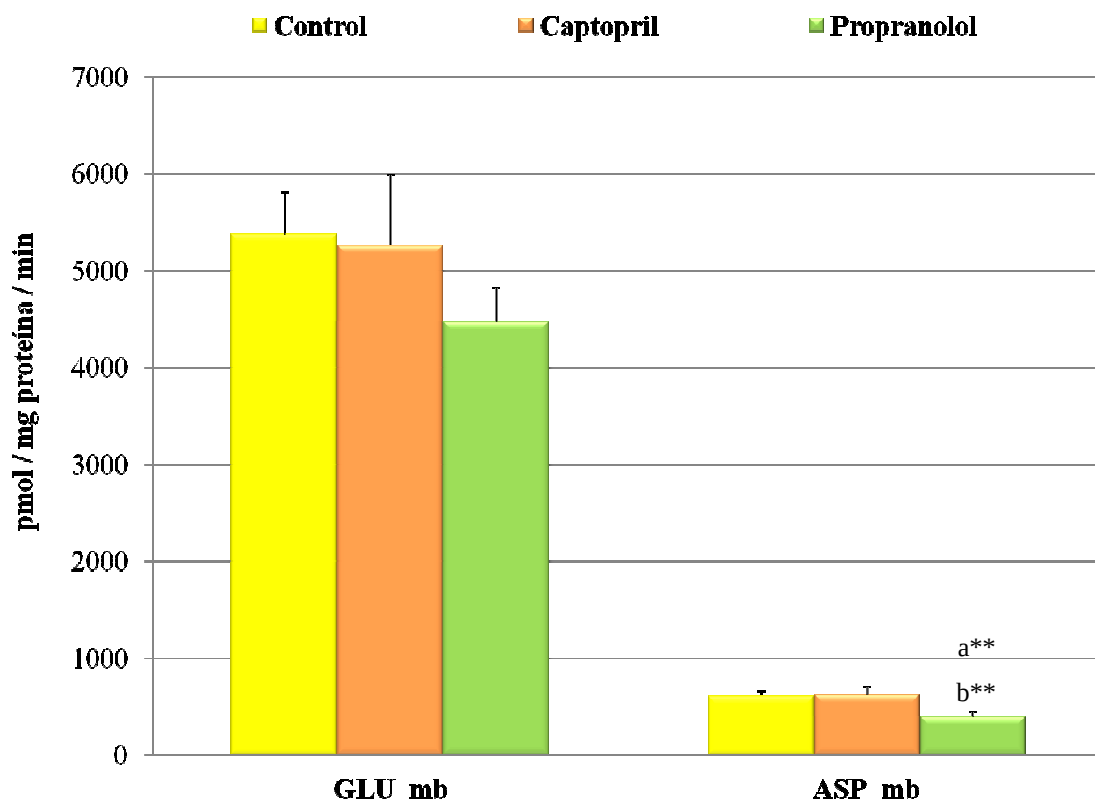
Gráfica 46. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8); expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol; * $p < 0,05$.

Podemos observar como las actividades solubles no parecen afectarse por ninguno de los dos tratamientos, con excepción de la actividad AspAP, donde los valores medios son algo inferiores en el grupo Propranolol, estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo Captopril (Gráfica 46).



Gráfica 47. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Es en la fracción unida a membrana donde ambos tratamientos parecen afectar a las actividades aminopeptidasas. Tanto el Captopril como el Propranolol disminuyen la actividad AlaAP (Gráfica 47), aunque sólo en el caso de éste último se alcanzan valores estadísticamente significativos, y el propranolol también hace descender la actividad AspAP (Gráfica 48).



Gráfica 48. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: b: diferencias entre los grupos Captopril y Propranolol; ** p< 0,01.

Se han descrito distintos tipos de alteraciones hipotalámicas en el modelo SHR que podrían estar relacionadas con el desarrollo de la hipertensión, entre ellas los cambios en los niveles de catecolaminas (de Wardener, 2001). También se ha demostrado la hiperactividad del SRA en el hipotálamo de las ratas SRH (Yang, 1992) y su interrelación con las catecolaminas (de Wardener, 2001), y al menos parte de los efectos del SRA cerebral sobre la presión arterial están mediados por el SNS (Gelband, 1998). En varios de los núcleos implicados en el control de la presión arterial, la activación de los receptores AT1 regula la captación, síntesis y liberación de la noradrenalina y de la dopamina (Raizada, 1993). El descenso de las actividades Ala y AspAP en los animales tratados con Propranolol podría estar también relacionado con el aumento de la actividad Gutamato Aminopeptidasa en suero, ya que son diversos los trabajos en los que se hace referencia a un comportamiento opuesto entre el SRA cerebral y el SRA sistémico (Kumar, 2007; Kloet, 2010; Grobe 2012).

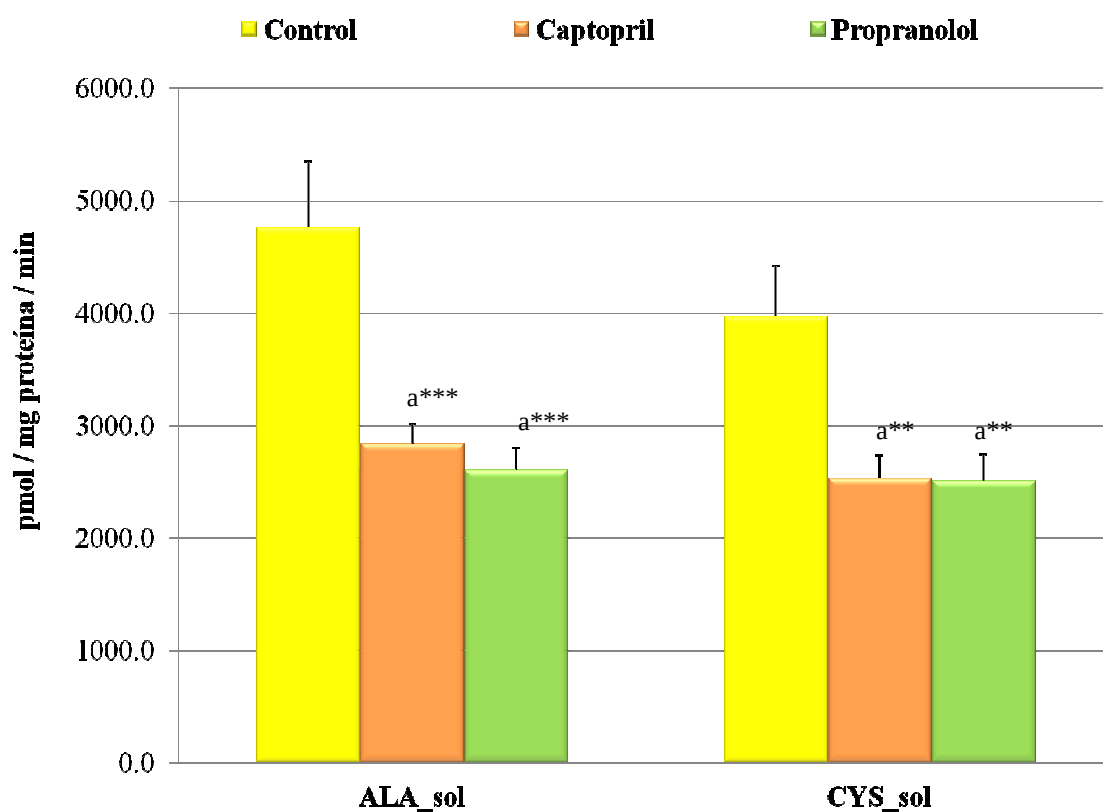
Los resultados obtenidos en el grupo tratado con Captopril difieren de los obtenidos en el hipotálamo de ratas WKY con el mismo tratamiento, donde las actividades GluAP y AspAP se incrementaron, mientras que las actividades AlaAP y CysAP no sufrieron cambios significativos (Villarejo et al., 2012).

El tratamiento con Propranolol tampoco parece tener los mismos efectos que en los animales normotensos, donde se ha descrito un aumento generalizado de las actividades Aminopeptidasas tras el tratamiento con dicho fármaco (Ramírez et al., 2009).

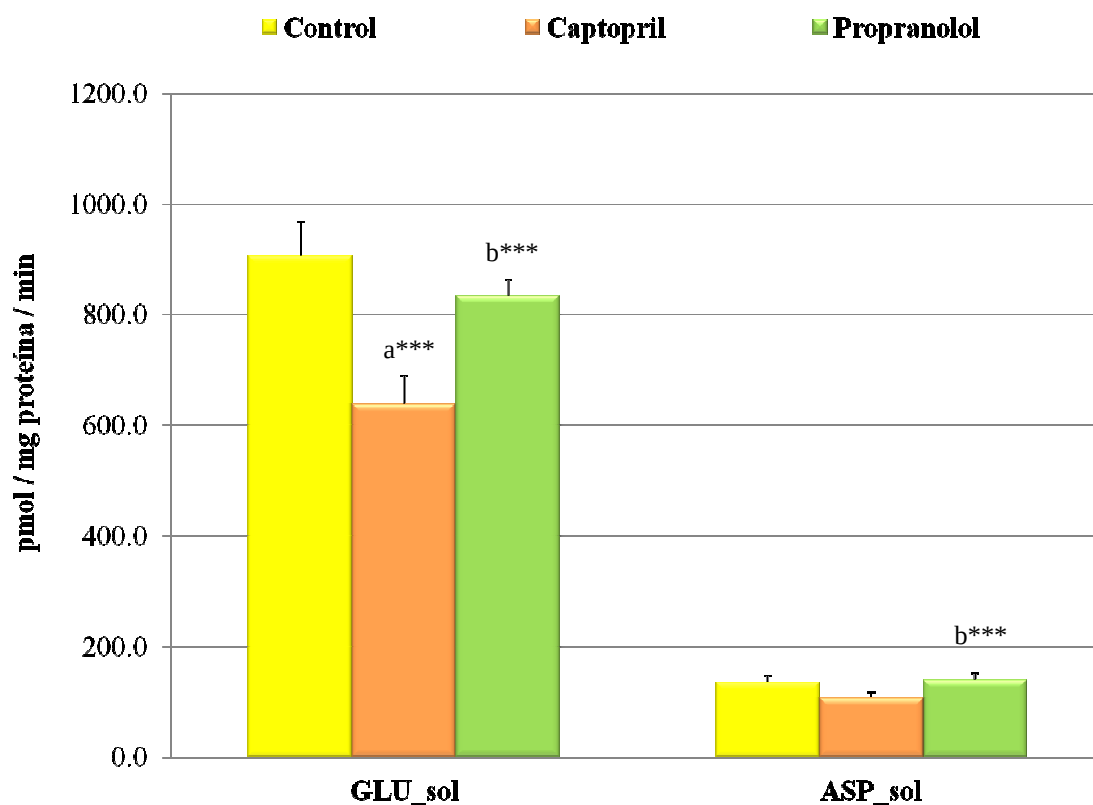
La disparidad de los resultados obtenidos en plasma y en hipotálamo podría indicar una distinta regulación neuroendocrina en las cepas normotensa (WKY) e hipertensa (SHR) (Ramírez et al., 2011).

5.2.3. FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS: CAPTOPRIL Y PROPRANOLOL. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL.

En las Gráficas 49 y 50 se muestran los valores de actividad de aminopeptidasas solubles en la corteza renal de los grupos Control, Captopril y Propranolol. En las Gráficas 51 y 52 se presentan los valores de actividad de aminopeptidasas en la fracción membrana de la corteza renal.

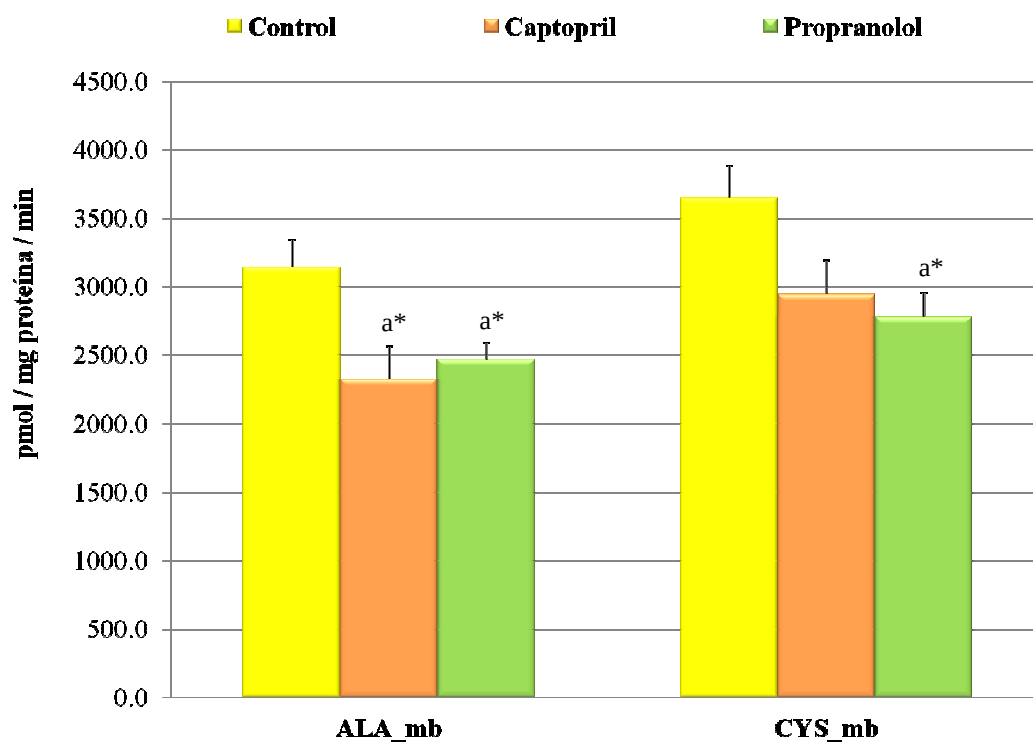


Gráfica 49. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; ** p<0,01; *** p<0,001.

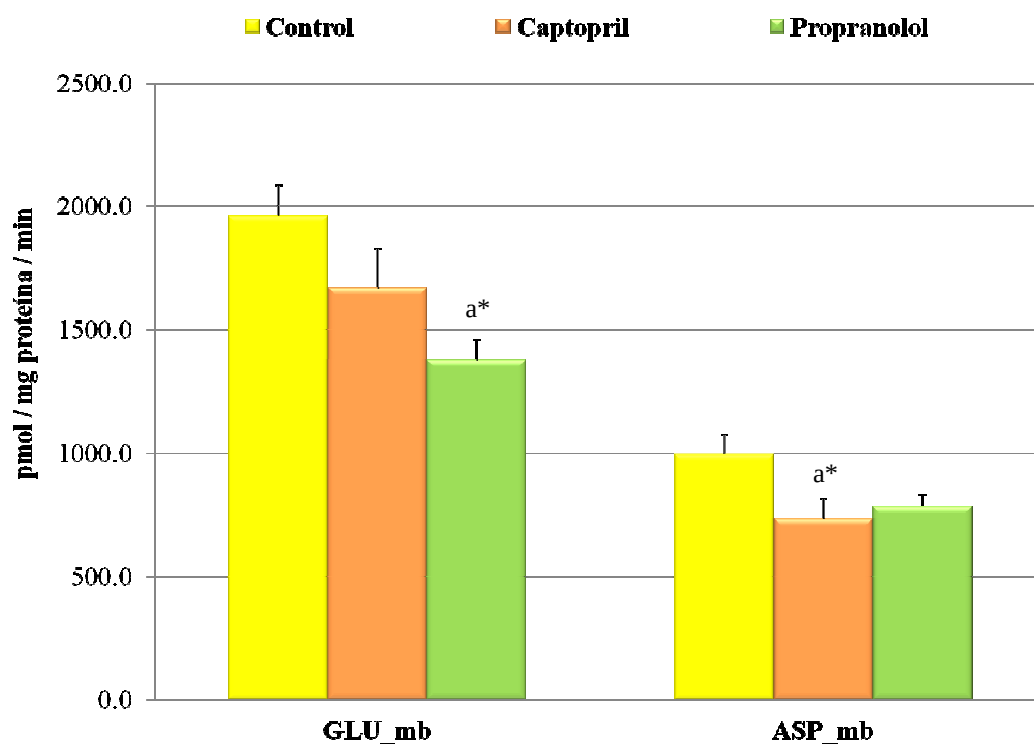


Gráfica 50. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; *** p<0,001.

Es muy llamativo el descenso que ambos tratamientos provocan en las actividades AlaAP y CysAP solubles de la corteza renal, disminución que también aparece en dichas actividades unidas a membrana, aunque en esta fracción no se alcanzan diferencias estadísticamente significativas. También disminuye la actividad GluAP soluble, aunque en este caso sólo tras el tratamiento con Captopril.

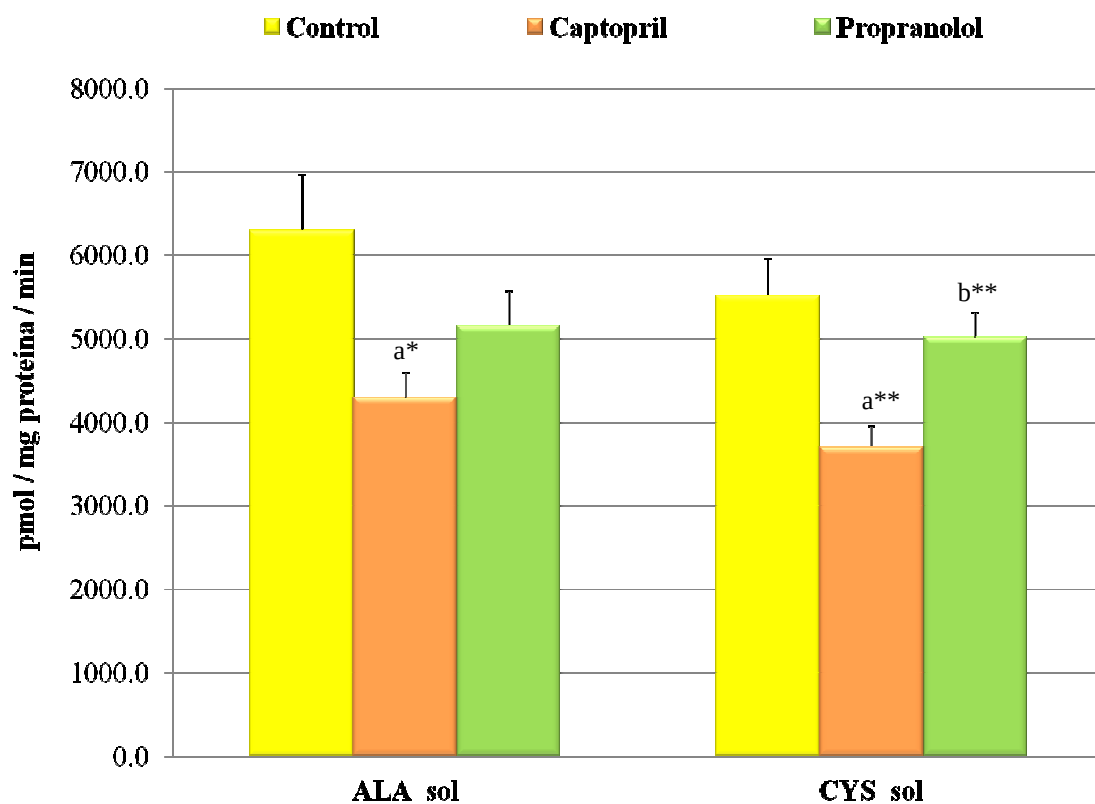


Gráfica 51. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. *p<0,05.

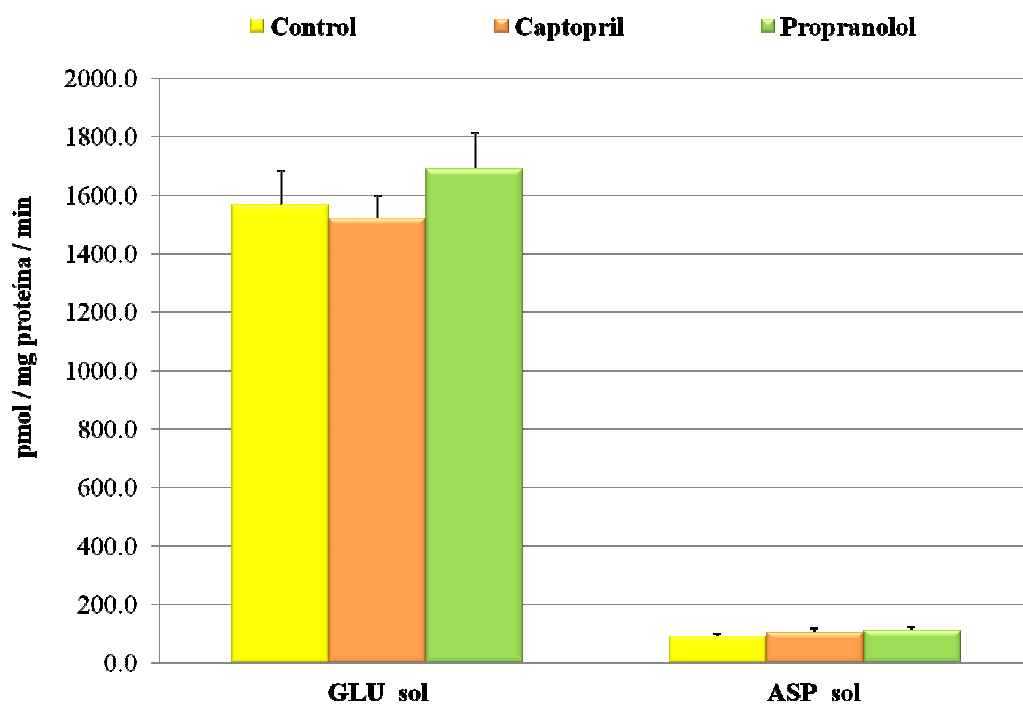


Gráfica 52. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. *p<0,05.

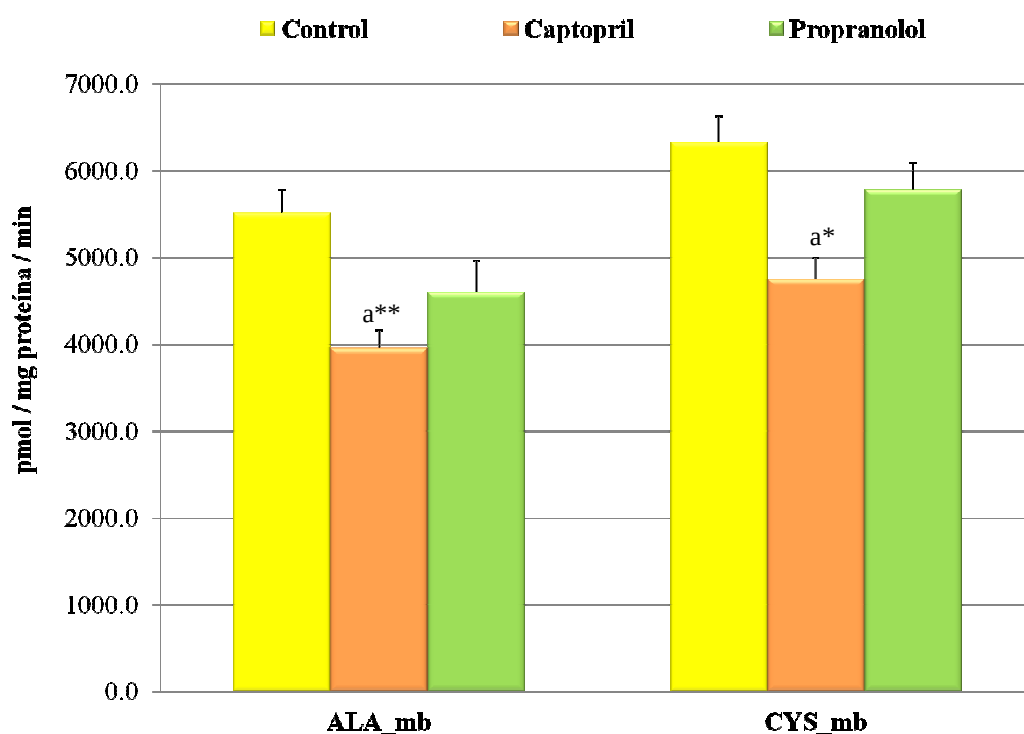
En las Gráficas 53 y 54 se representan los valores de actividad soluble en la médula renal y en las Gráficas 55 y 56 los valores correspondientes a la fracción unida a membrana. En la médula renal también obtuvimos menores niveles de actividad tras el tratamiento con Captopril en comparación con los controles (AlaAP y CysAP tanto soluble como unida a membrana y GluAP y AspAP en la fracción de membrana).



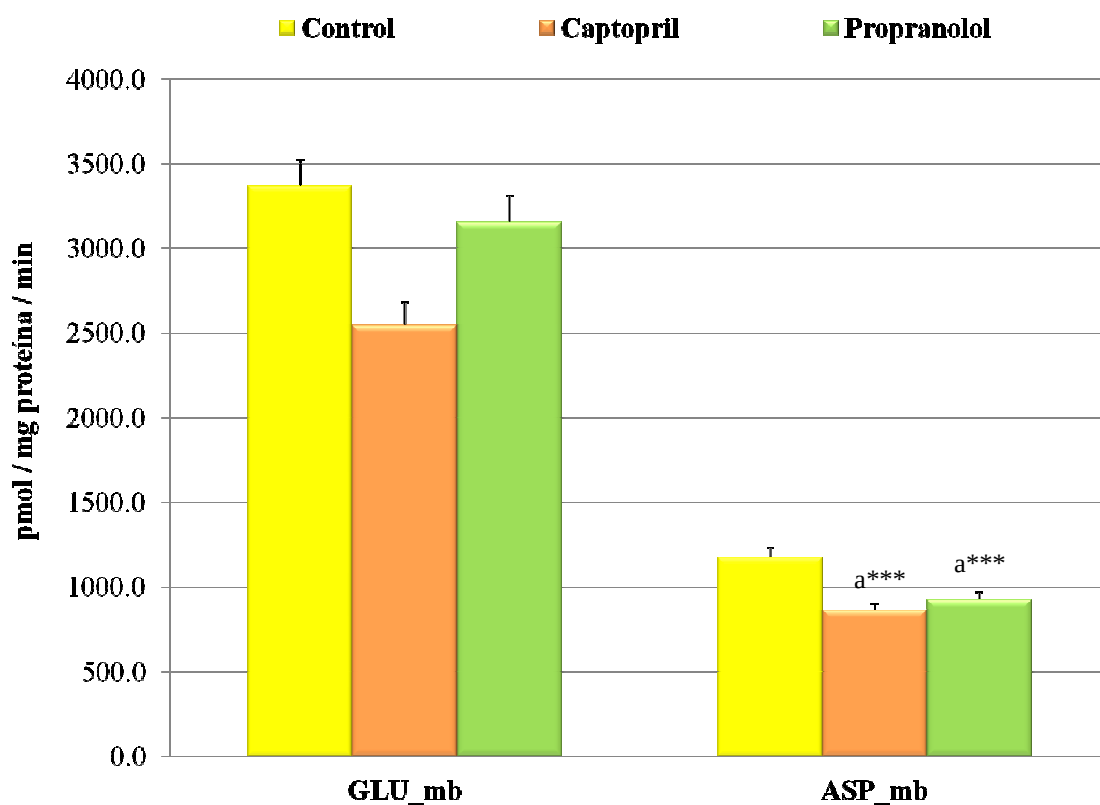
Gráfica 53. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Gráfica 54. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 55. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Gráfica 56. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8), Captopril (n=8) y Propranolol (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen: a: diferencias con respecto al grupo Control; *** p<0,001.

El sistema renina angiotensina intrarenal es regulado de forma independiente al SRA sistémico y juega un papel relevante en el mantenimiento de la hipertensión. La activación de este sistema local en el curso de distintas patologías puede desembocar en fibrosis y daño renal. De hecho, los niveles de angiotensinas en el riñón son superiores a los del plasma o cualquier otro órgano (Kobori et al., 2007, Velez, 2009). Un incremento de la Ang II en el riñón podría ser la causa del desarrollo de la hipertensión en estos animales, disminuyendo la tasa de filtración glomerular y el flujo sanguíneo renal, efectos que revierten tras el tratamiento con los inhibidores del ECA (Arendshorst et al., 1990). El tratamiento con captopril en SHR disminuye la expresión de los receptores AT1 en el riñón (Cheng et al., 1998) y los niveles renales de angiotensinógeno. La disminución de las actividades aminopeptidasas que nosotros encontramos en el riñón tras el tratamiento con Captopril podría estar relacionada con el efecto local de este fármaco a nivel renal, y podría responder a una disminución en sus

sustratos, fundamentalmente la Ang II y la Ang III, originada por la inhibición de la actividad del ECA. Este resultado apoyaría la hipótesis de que el efecto antihipertensivo del Captopril estaría mediado en parte por la inhibición de los SRA locales, y en particular del renal, ya que el tratamiento con este fármaco no modificó ninguna de las actividades estudiadas en plasma.

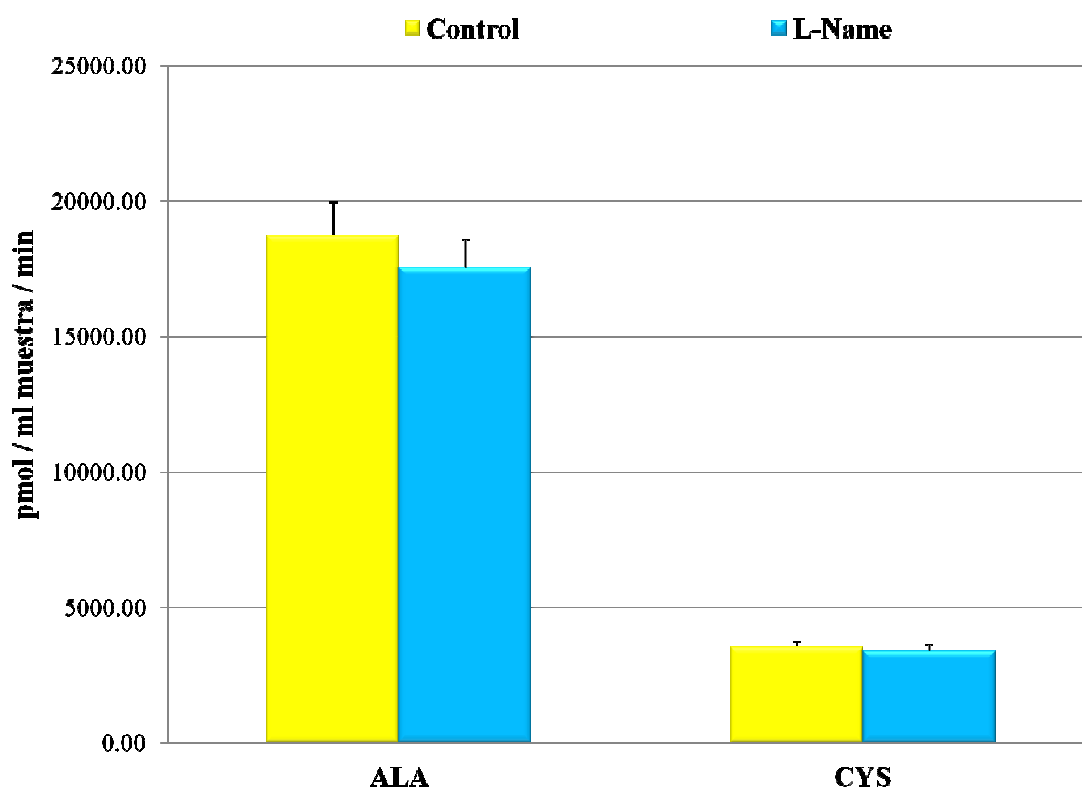
La disminución generalizada de las actividades Aminopeptidasas en el riñón tras el tratamiento con Captopril podría indicar que no existe una predominancia de una angiotensina en particular en el riñón, donde el tratamiento con captopril provoca una inhibición generalizada del RAS, lo que está de acuerdo con resultados previos (Hu et al., 1996). Sin embargo, en los animales normotensos (Villarejo et al., 2012) aunque se observa una tendencia al aumento de estas actividades en la corteza renal, no se llegan a alcanzar diferencias estadísticamente significativas, mientras que en la médula renal si disminuyen significativamente.

En cuanto al tratamiento con Propranolol, también produjo la disminución de algunas de las actividades renales, aunque el tratamiento con β -bloqueantes ha demostrado no afectar a la expresión intrarenal de renina (Kitami et al., 1989) ni, en algunas ocasiones, a los valores de presión arterial (Takada et al., 1986).

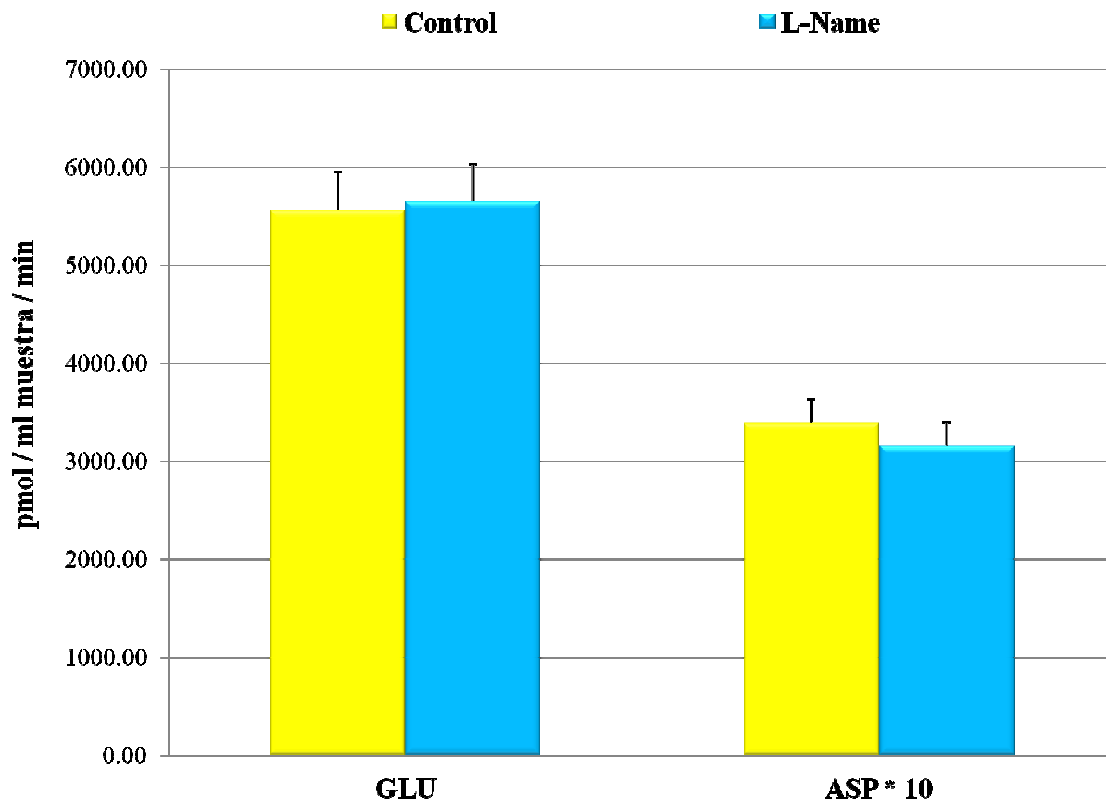
5.3. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE L-NAME.

5.3.1. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO.

En las Gráficas 57 y 58 se muestran los valores de actividad Ala, Cys, Glu y AspAP en plasma de los grupos Control y L-NAME, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos para ninguna de las actividades analizadas.



Gráfica 57. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades plasmáticas Alanina (ALA) y Cisteína (CYS) Aminopeptidasa para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/ml muestra/min.



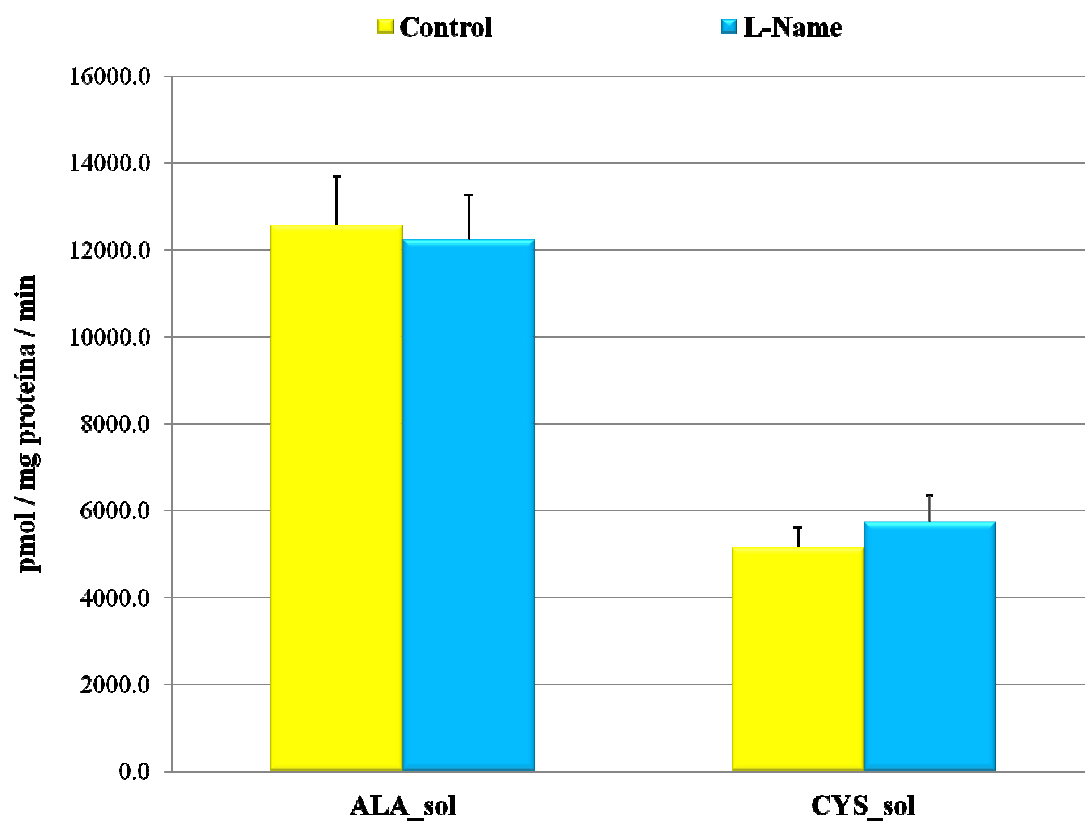
Gráfica 58. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades plasmáticas Glutámico (GLU) y Aspártico (ASP) Aminopeptidasa para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/ml muestra/min.

El tratamiento con L-NAME provoca una inhibición de la formación de óxido nítrico, lo cual revierte en un aumento mucho mayor de los valores de presión arterial con respecto a los animales SHR controles (Gráfica 12), junto con una mayor diuresis (Gráfica 18), menores valores de NO en plasma (Gráfica 20) y mayores de isoprostanos (Gráfica 23).

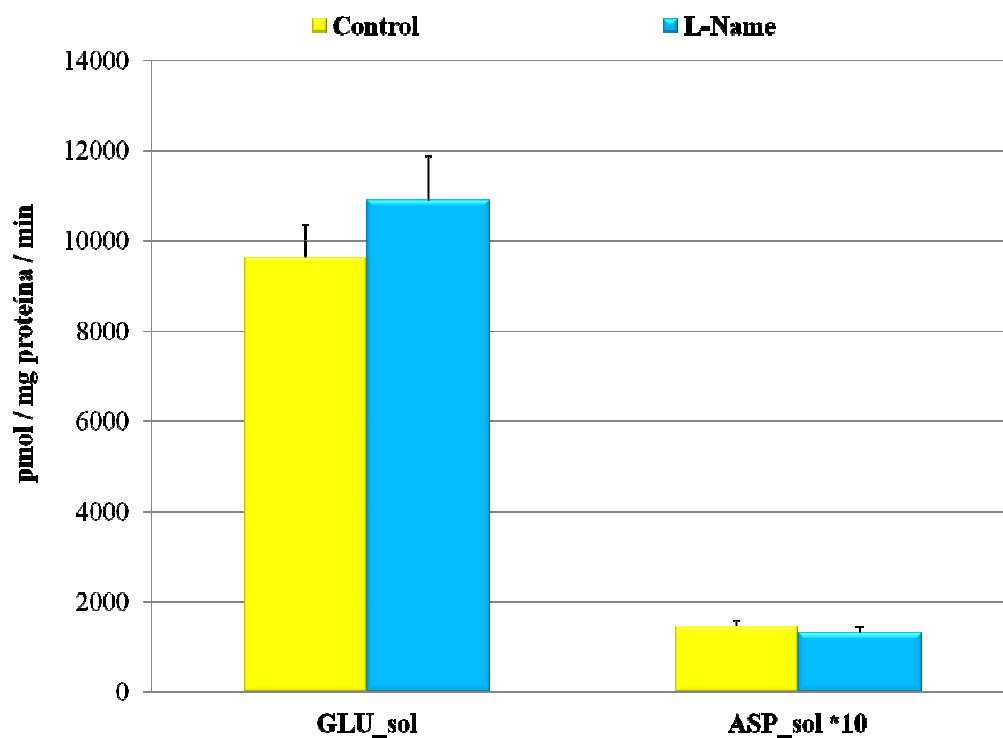
Se ha propuesto que en el modelo SHR los aumentos de la presión arterial podrían estar, en parte, amortiguados por una mayor producción de NO lo que explicaría el notable aumento de los valores de PA en los animales SHR a los que se les administra L-NAME (Schnackenberg et al., 1998). Aunque se ha propuesto una relación entre el NO, el SNS y el SRA en la génesis de la hipertensión en este modelo animal (Qadri et al., 2003; Cerrato et al., 2012), nuestros resultados apuntan a que la inhibición de la formación del NO no afectaría al metabolismo de las angiotensinas, al menos a nivel del SRA sistémico.

5.3.2. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL.

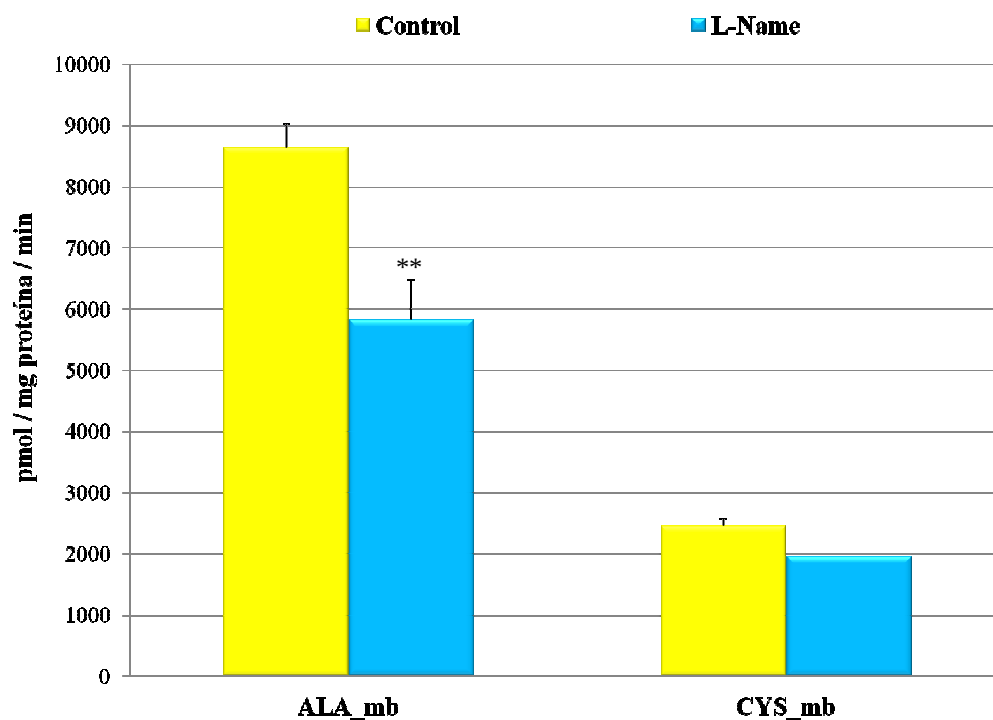
En las gráficas 59 y 60 se muestran los valores medios de actividades aminopeptidasas solubles en hipotálamo. En las gráficas 61 y 62 se representan estas mismas actividades pero en la fracción de membrana.



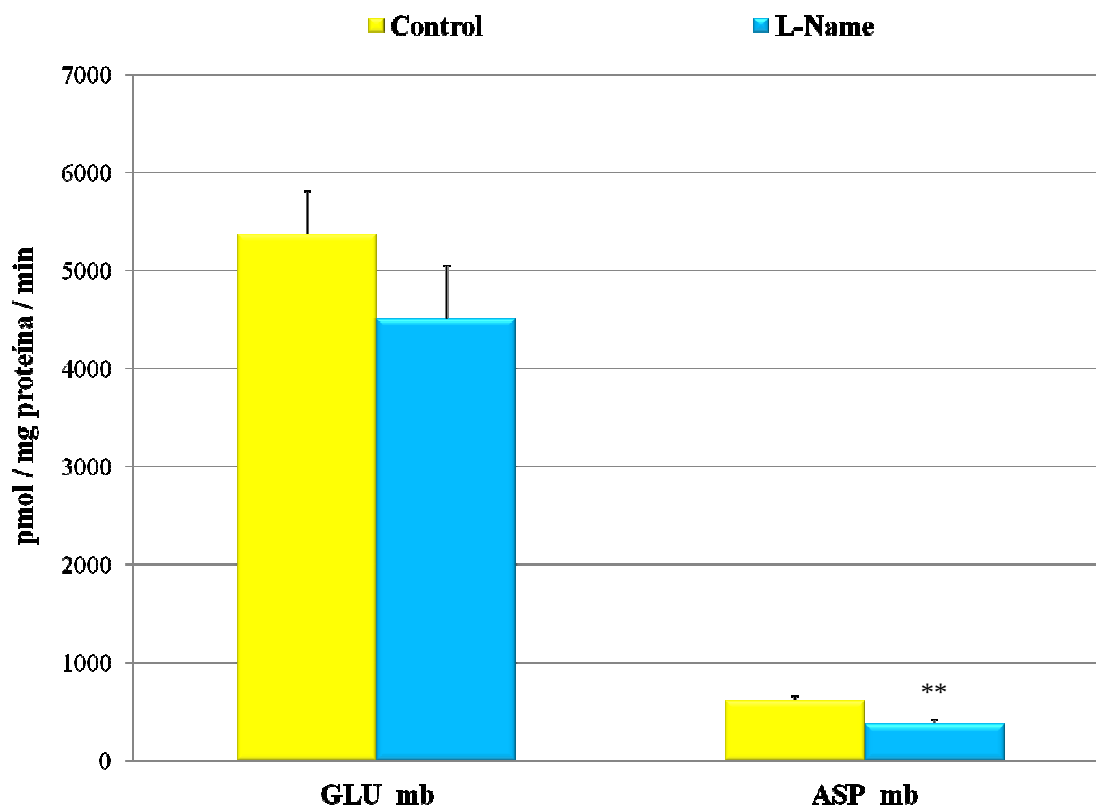
Gráfica 59. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 60. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 61. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas. ** $p < 0,01$.



Gráfica 62. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** p<0,01.

Se observa cómo el tratamiento con el inhibidor de la síntesis del NO (L-NAME) afecta exclusivamente a las actividades localizadas en la fracción de membrana, ocasionando una disminución de las mismas que alcanza los valores de significación estadística para el caso de las actividades AlaAP y AspAP.

Este comportamiento de la actividad aminopeptidasa en el hipotálamo de las ratas SHR es totalmente contrario al de los animales normotensos, donde la administración del inhibidor de la síntesis del NO provoca un aumento de determinadas actividades aminopeptidasas (Segarra et al., 2010). La disminución de la actividad AlaAP podría estar relacionada con un menor metabolismo de la AngIII a AngIV, mientras que los menores niveles de actividad AspAP harían descender la bioconversión de la AngI en des-Asp-AngI y la formación de AngIII. Dichos cambios podrían relacionarse con cambios en la concentración de AngIII en el hipotálamo de los animales que fueron tratados con L-NAME.

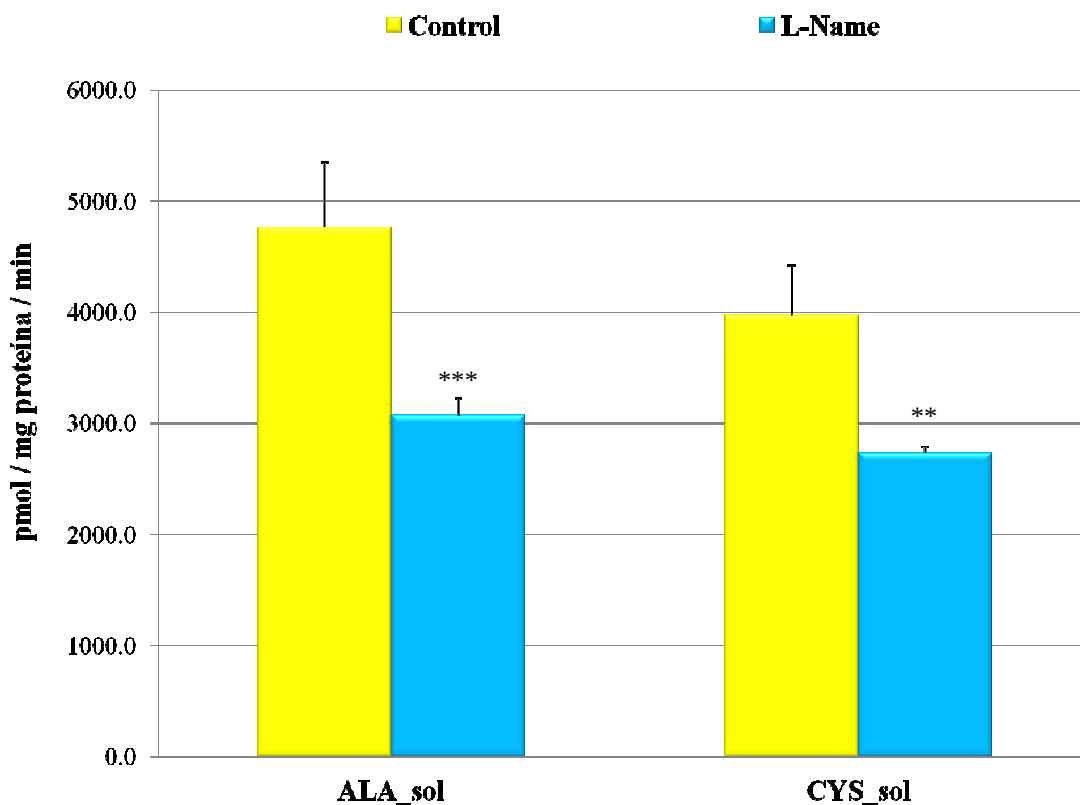
Desde hace tiempo se sabe que los niveles, tanto de AngII como de los receptores AT1 están elevados en los animales SHR, y que este aumento se relaciona con un incremento del tono simpático (De Wardener, 2001). La principal isoforma de la óxido nítrico sintasa en el cerebro es la neuronal (nNOS), junto con sólo un 5% de la isoforma endotelial (eNOS). La concentración de NO está regulada por la actividad de estas enzimas, que en el hipotálamo se co-localizan con la AngII (De Wardener, 2001).

La administración intracerebroventricular de NO provoca una caída en los valores de PA que es mayor en los animales SHR que en los normotensos. Si embargo, la administración de los inhibidores de la NOS (L-NAME) tiene menores efectos en los animales SHR que en los controles. Estos resultados podrían indicar que en el modelo SHR la actividad NOS central, y por tanto la producción de NO, está disminuida, siendo esta una de las causas de la hipertensión (Cabrera et al., 1997). Además, sabemos que existe una relación entre el NO y el SRA hipotalámico, ya que el tratamiento con L-NAME en ratas normotensas sometidas a estrés por inmovilización incrementa el número de receptores AT1 (Kiss et al., 2001).

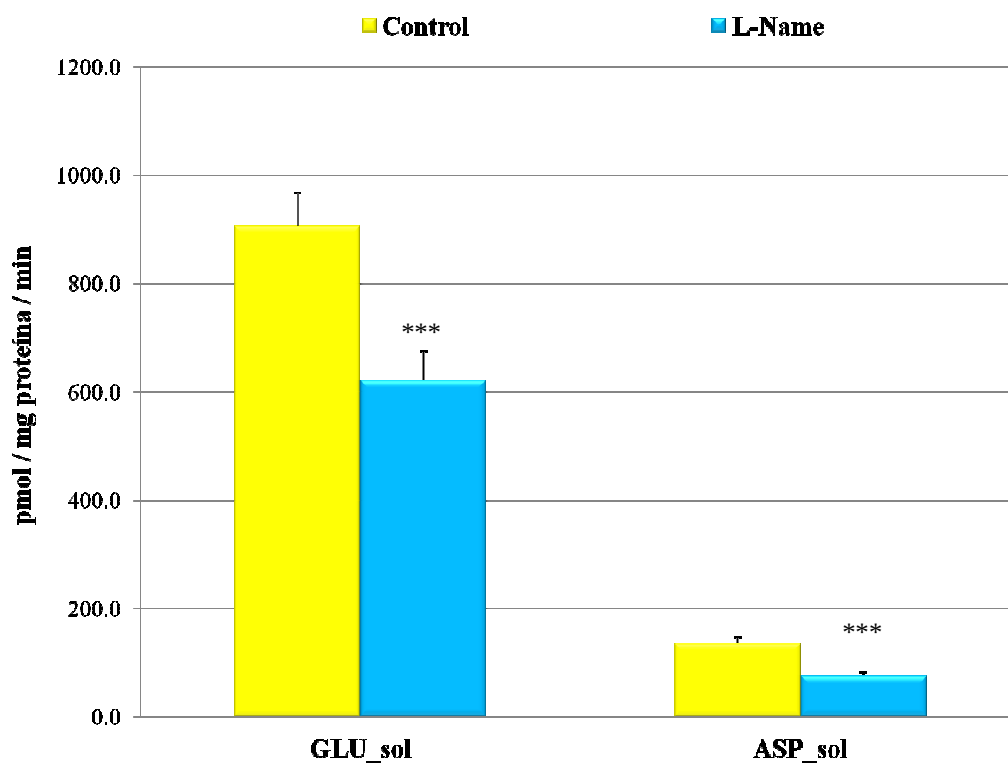
Nuestros resultados apuntan a una disminución en los niveles de actividad de las aminopeptidasas implicadas en el metabolismo de la AngIII como consecuencia del tratamiento con L-NAME. La AngIII es el principal péptido bioactivo del SRA cerebral (Réaux et al., 1999) por lo que la prolongación de su vida media podría relacionarse con el mayor aumento de los niveles de presión arterial en estos animales.

5.3.3. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL.

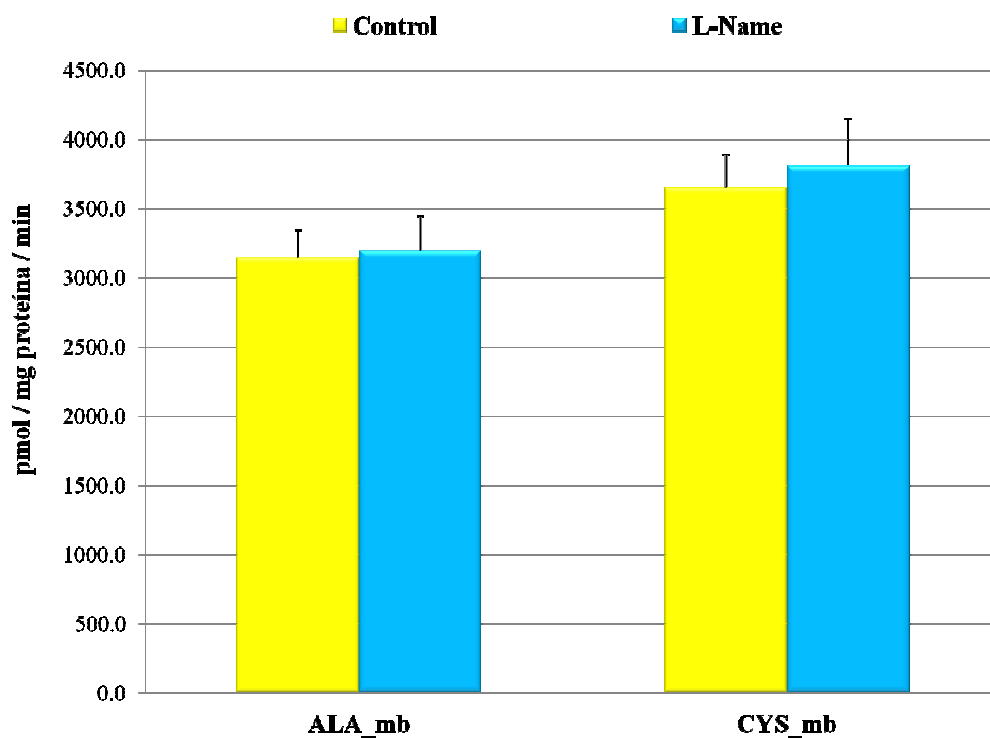
En las Gráficas 63 y 64 se muestran los valores de actividades aminopeptidasas solubles en la corteza renal, y en las Gráficas 65 y 66 los correspondientes a la fracción de membrana. Además, se representan los valores de actividades solubles (Gráficas 67 y 68) y unidas a membrana (Gráficas 69 y 70) en la médula renal.



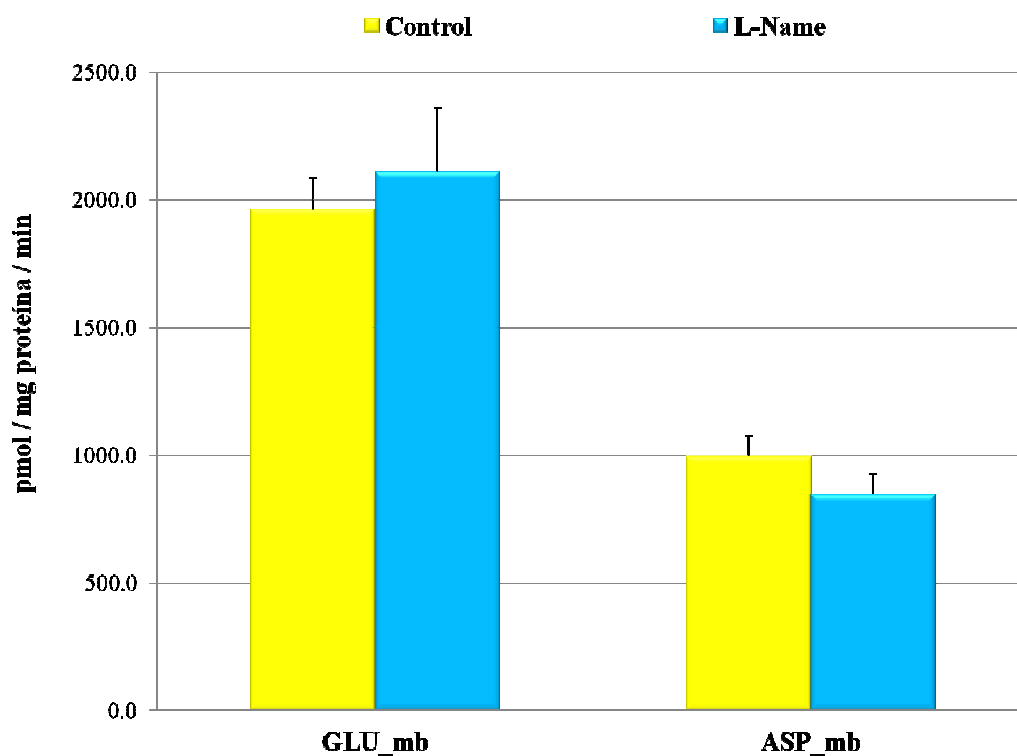
Gráfica 63. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



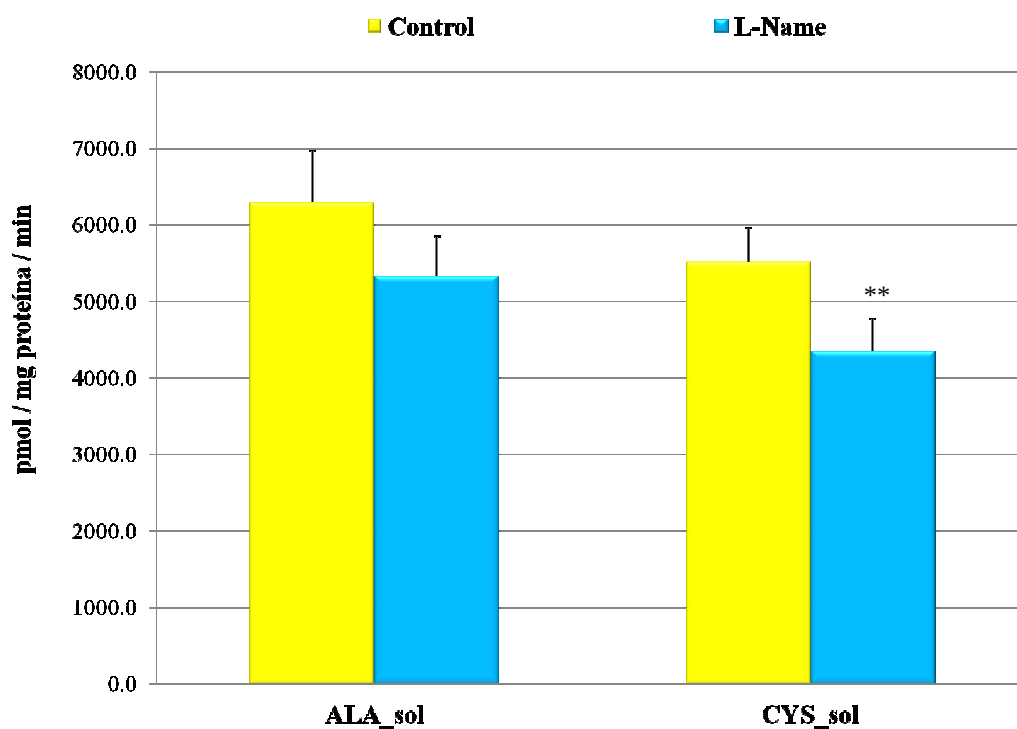
Gráfica 64. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ***p<0,001.



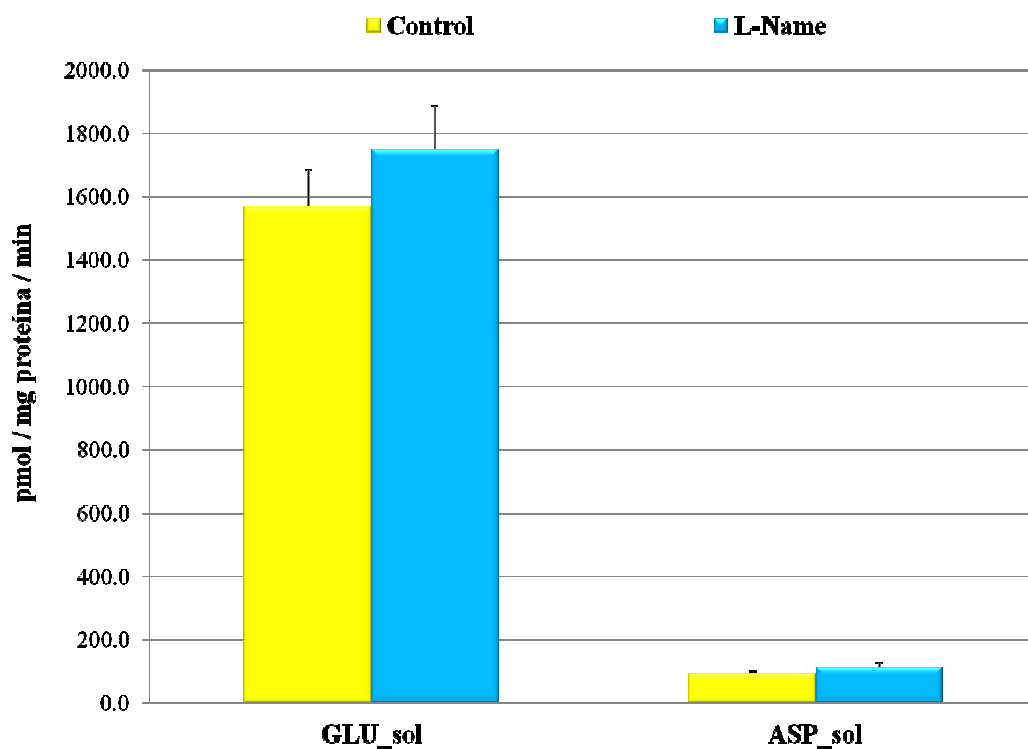
Gráfica 65. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



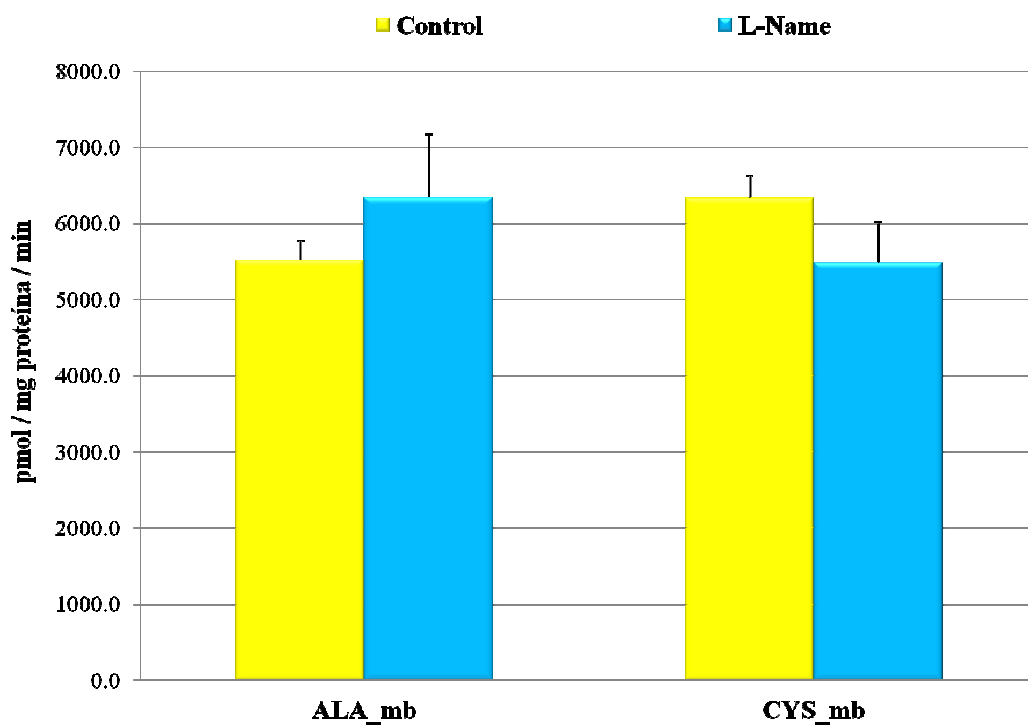
Gráfica 66. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de corteza renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



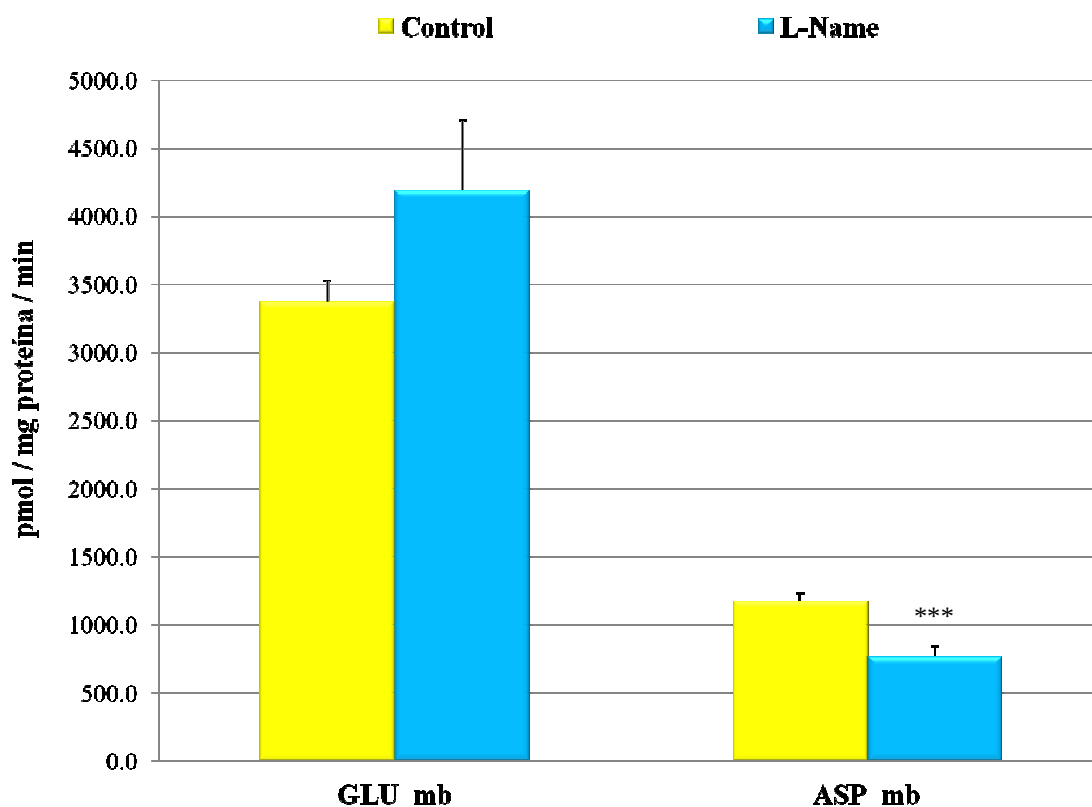
Gráfica 67. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. ** p<0,01.



Gráfica 68. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Amino-peptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 69. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Amino-peptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 70. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de médula renal para los grupos Control (n=8) y L-NAME (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ***p<0,001.

A diferencia de lo que sucede en el plasma, se observa una disminución casi generalizada de las actividades aminopeptidasas en la corteza renal, y más concretamente de las actividades solubles. Está bien descrita la relación entre el SRA renal y el óxido nítrico así, la sobreexpresión del SRA en animales hipertensos estaría asociada a una disminución en la producción de NO y a la aparición de daño renal (Schulman et al., 2010), estando esta disminución del NO asociada también a un aumento en los niveles de estrés oxidativo (Shin et al., 2009). Además, el efecto vasodilatador de los receptores AT₂ estaría, al menos en parte, mediado por la liberación de NO (Siragy, 2000). La administración de L-NAME incrementa los niveles de PA y las lesiones glomerulares y tubulares, causando una disminución en la función renal, efectos que pueden ser evitados por el bloqueo del SRA tanto con inhibidores del ECA como con los bloqueantes del AT₁ (De Nicola et al., 1992; Jover y Mimran, 2001). En este sentido, el bloqueante del receptor AT₁ Losartan, previene la disminución en la reabsorción tubular ocasionada por el L-NAME.

El bloqueo farmacológico del SRA previene las alteraciones renales inducidas por la inhibición de la síntesis del NO sólo cuando los niveles endógenos de AngII están elevados, lo que sugiere que el NO tiene un efecto vasodilatador protector en aquellos estados en los que hay un incremento crónico de la AngII (Jover y Mimran, 2001).

En los animales SHR, parte de los efectos debidos a la activación del SRA podrían estar amortiguados por una mayor producción de NO, lo que explicaría que la administración de L-NAME agudice la hipertensión. En el riñón, el menor nivel de actividad de las aminopeptidasas que participan en la cascada del SRA, podría estar relacionado con una menor transformación de la AngII en AngIII y AngIV, y por tanto, una mayor vida media para la Ang II y consecuentemente un incremento en sus efectos hipertensores.

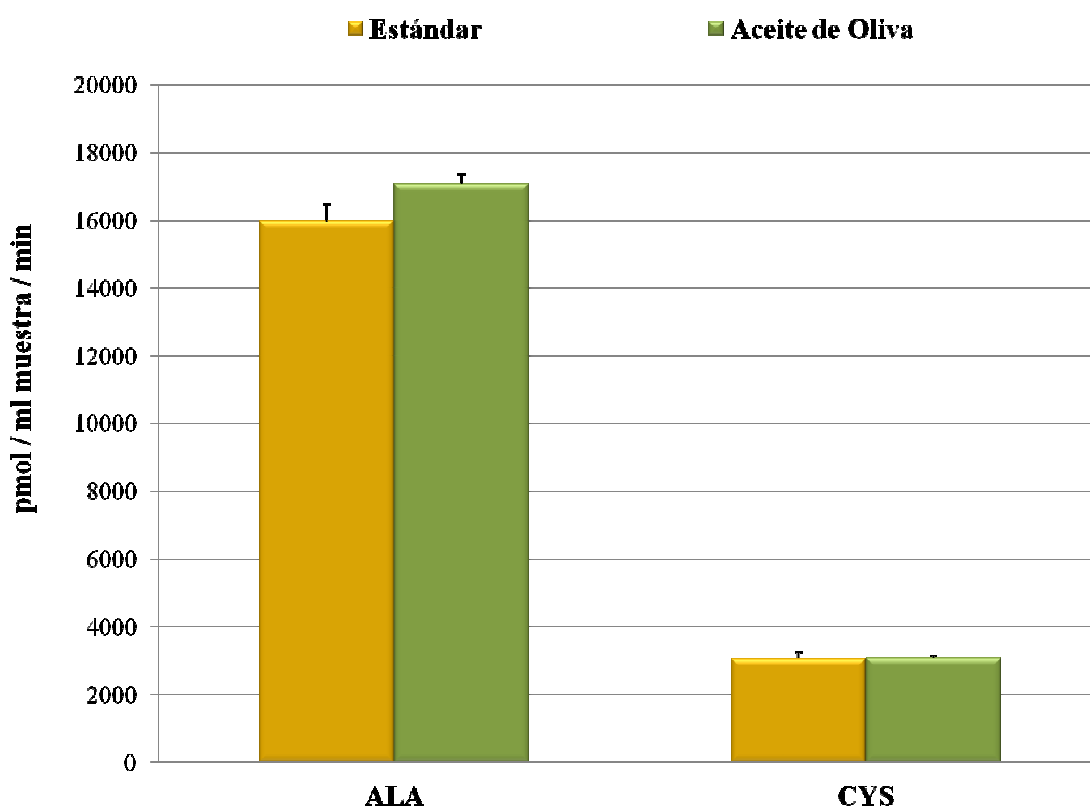
Estos resultados también podrían sugerir una mayor disponibilidad de la hormona antidiurética a este nivel, lo cual implicaría un aumento en la reabsorción de agua que podría contribuir a los altos valores de PA desarrollados por los animales tras el tratamiento con L-NAME.

Estos resultados son similares a los obtenidos tras el tratamiento con propranolol, y estarían de acuerdo con la existencia de una inhibición simpática en las ratas tratadas con L-NAME (Liu et al., 1998)

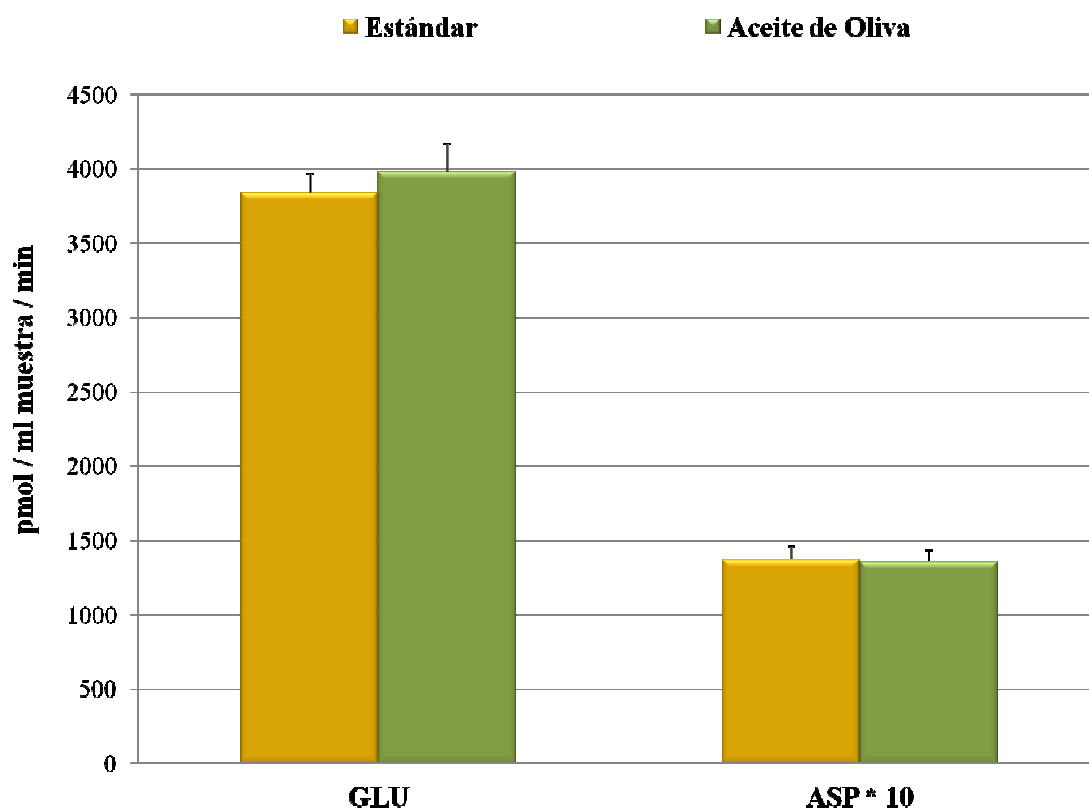
5.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS.

5.4.1. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA SISTÉMICO DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

En las gráficas 71 y 72 se muestran los valores de actividades Ala, Cys, Glu y AspAP para los grupos Estándar y Aceite de Oliva Virgen Extra. Los resultados indican que la administración de la dieta durante el periodo experimental de tres meses no produjo ninguna modificación sobre las cuatro actividades estudiadas.



Gráfica 71. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades plasmáticas Alanina (ALA) y Cisteína (CYS) Aminopeptidasa para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/ml muestra/min.



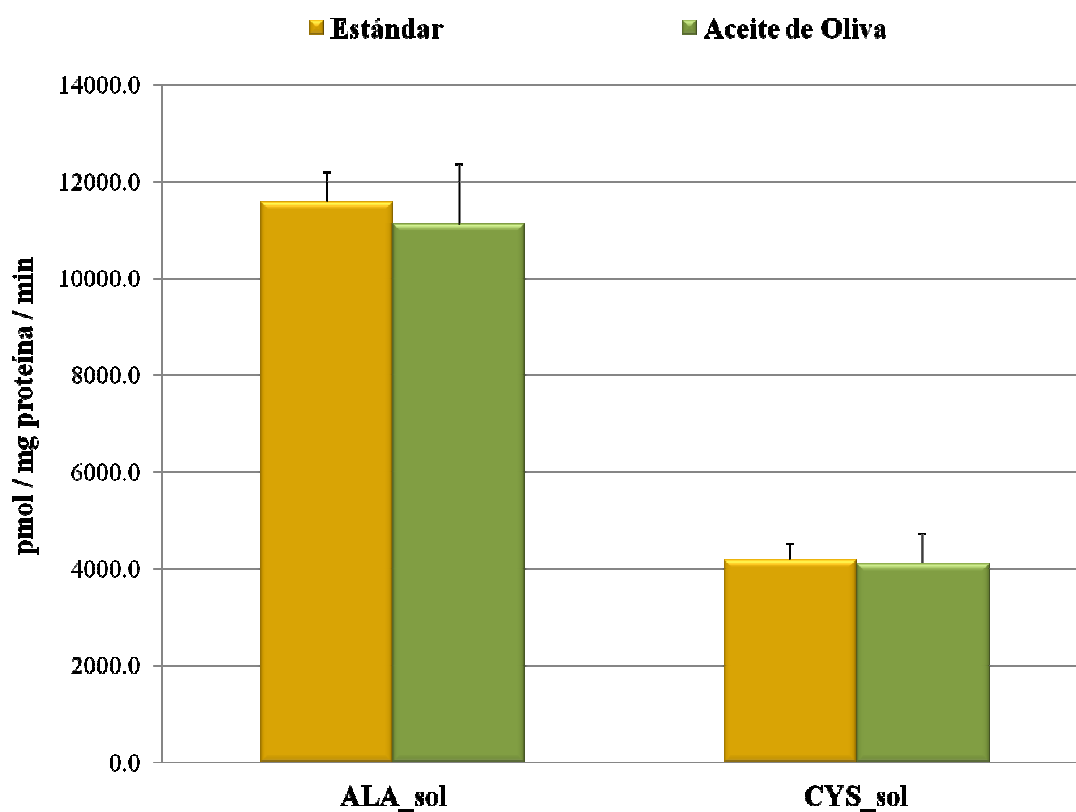
Gráfica 72. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades plasmáticas Glutámico (GLU) y Aspártico (ASP) Aminopeptidasa para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/ml muestra/min.

Es muy poco lo que se conoce, hasta el momento, sobre los efectos del aceite de oliva virgen extra sobre el SRA sistémico. En un estudio realizado previamente por nuestro grupo de investigación (Arechaga et al., 2001) se demostró que las actividades Glu y AspAP en plasma se incrementaban con el grado de saturación de la grasa dietética, si bien hay que tener en cuenta que dichos estudios fueron llevados a cabo en ratones normotensos y con unos niveles de grasa en la dieta mucho menores (10%).

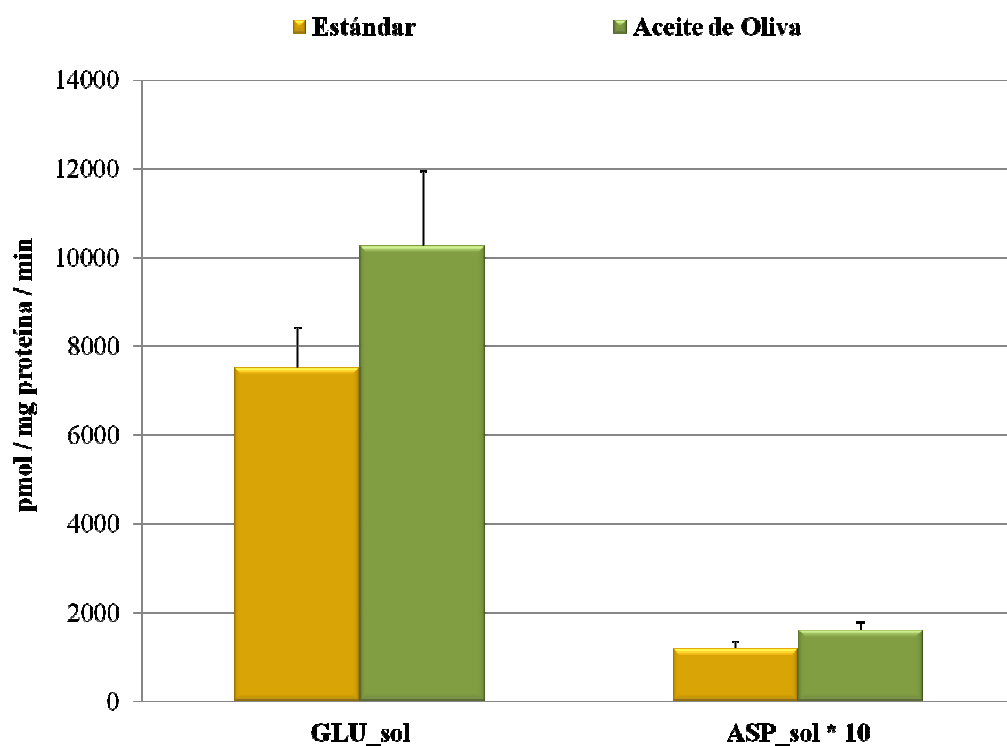
Sin embargo, sí que está bien establecida la relación entre las dietas altas en grasa y el RAS, siempre y cuando éstas vayan asociada a la obesidad, ya que en los animales obesos existe una sobreestimulación del SRA sistémico (Mathai et al., 2011; Santos et al., 2012; Kalupahana y Moustaid-Moussa, 2012). Por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con el hecho de que la dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra no produjo aumento en los valores de peso corporal (Gráfica 25), a pesar de ser una dieta alta en grasa.

5.4.2. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA CEREBRAL DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

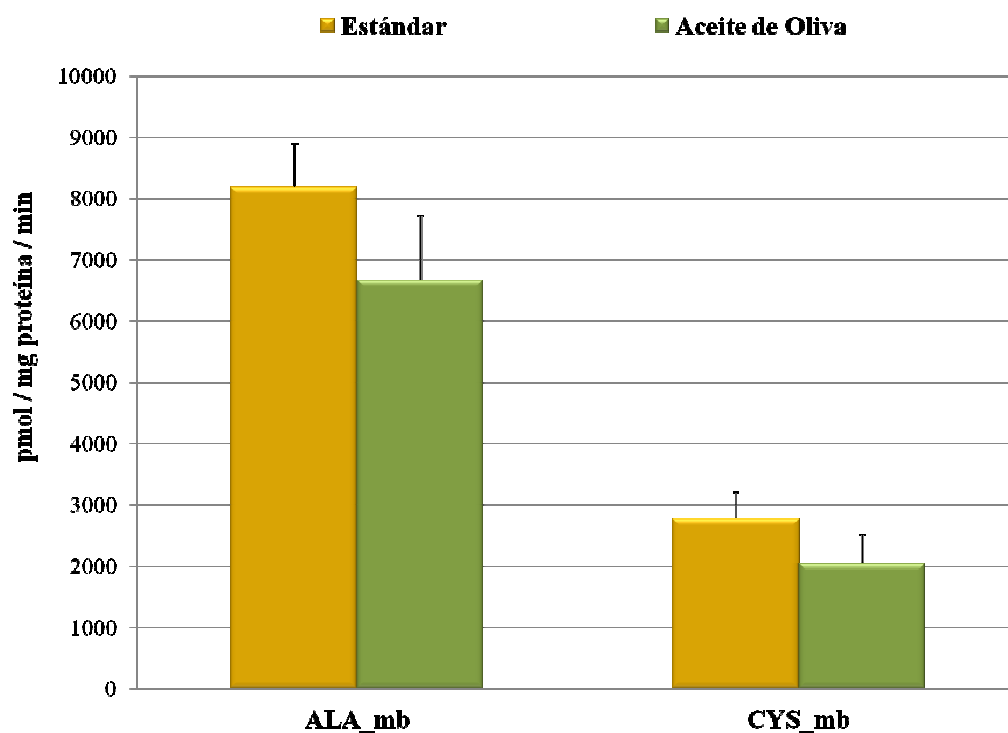
En las gráficas 73 y 74 se muestran los valores medios de actividad Ala, Cys, Glu y AspAP en la fracción soluble del hipotálamo de los animales pertenecientes a los grupos Estándar y Oliva Virgen. En las gráficas 75 y 76 aparecen estos mismos valores pero en la fracción de membrana. No encontramos variaciones sobre ninguna de las variables estudiadas.



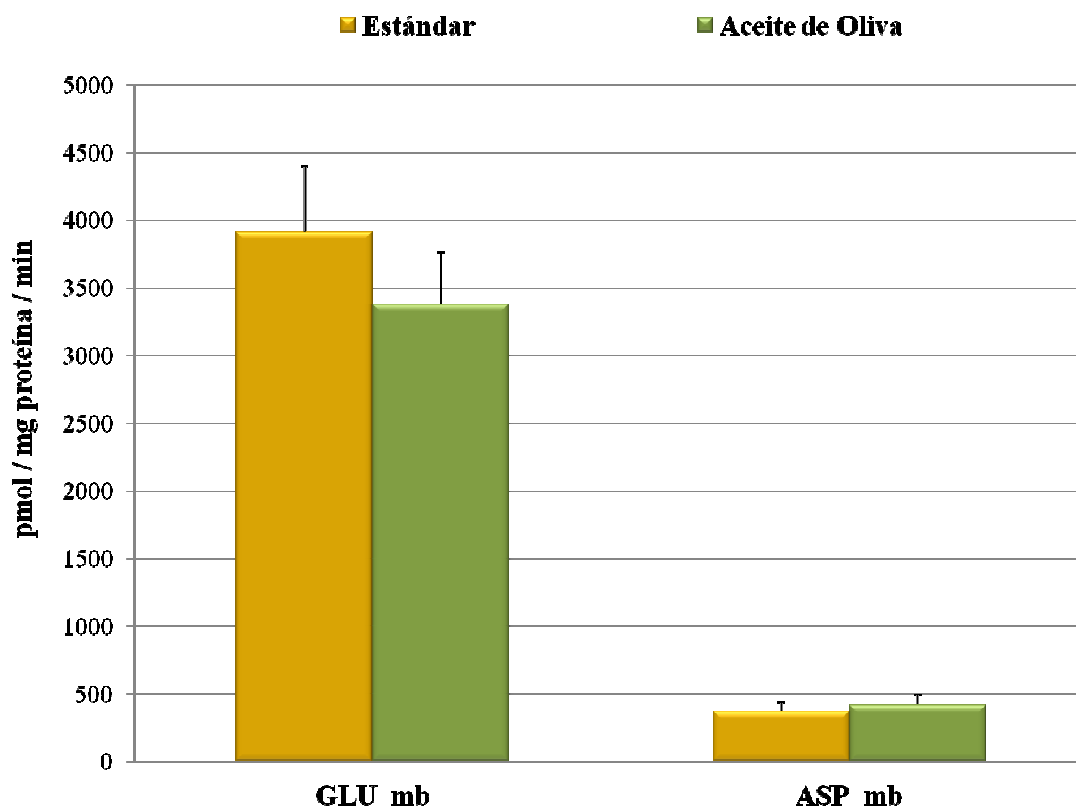
Gráfica 73. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 74. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Estándar(n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 75. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.

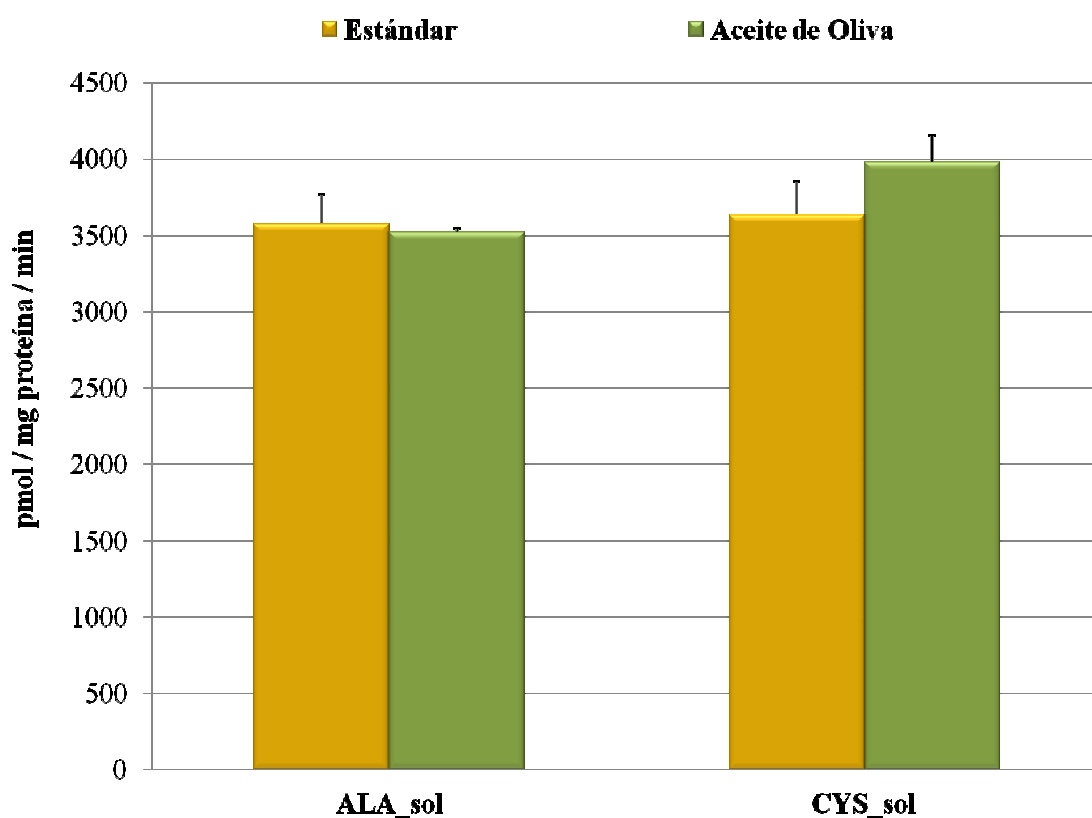


Gráfica 76. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Amino-peptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de hipotálamo para los grupos Estándar(n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.

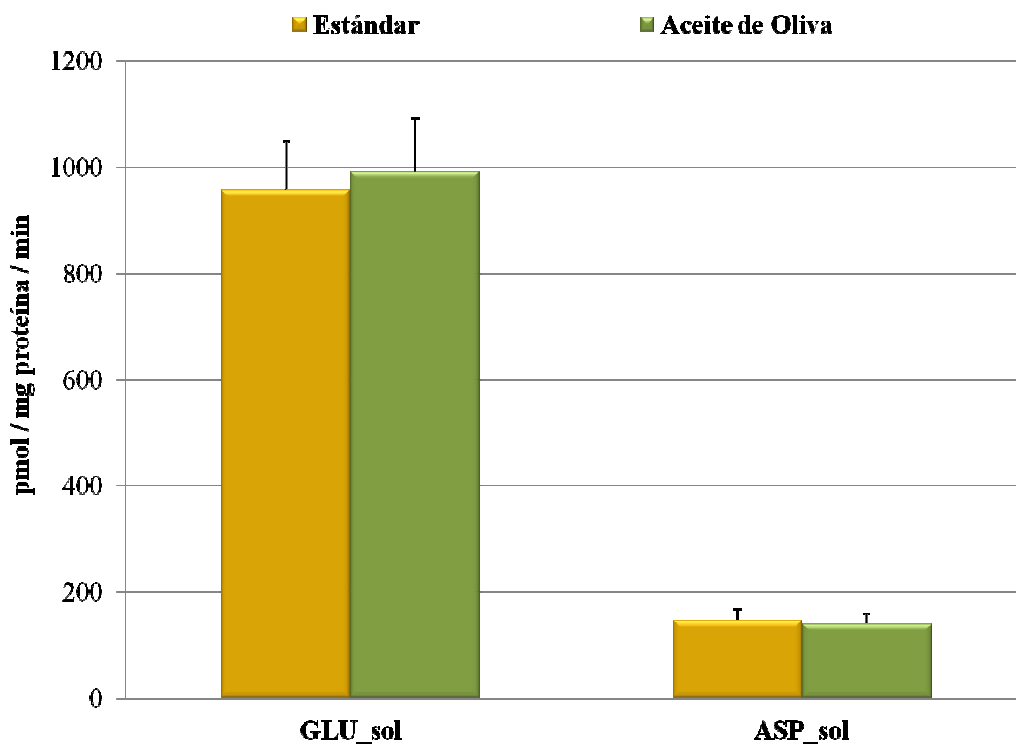
El SRA cerebral se ha relacionado, entre otras cosas, con la regulación de la presión arterial y con la homeostasis energética (Wright y Harding, 2011; Marc y Llorens-Cortes, 2011). Se ha postulado una inhibición del SRA cerebral en los animales obesos, vinculada a una menor actividad simpática responsable del menor gasto energético en estos animales (de Kloet et al., 2010, Grobe et al., 2012). La falta de modificaciones en la actividad aminopeptidasa hipotalámica estaría de acuerdo, en principio, con el mantenimiento del peso corporal en estos animales.

5.4.3. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTRA-RENAL DE UNA DIETA ENRIQUECIDA EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.

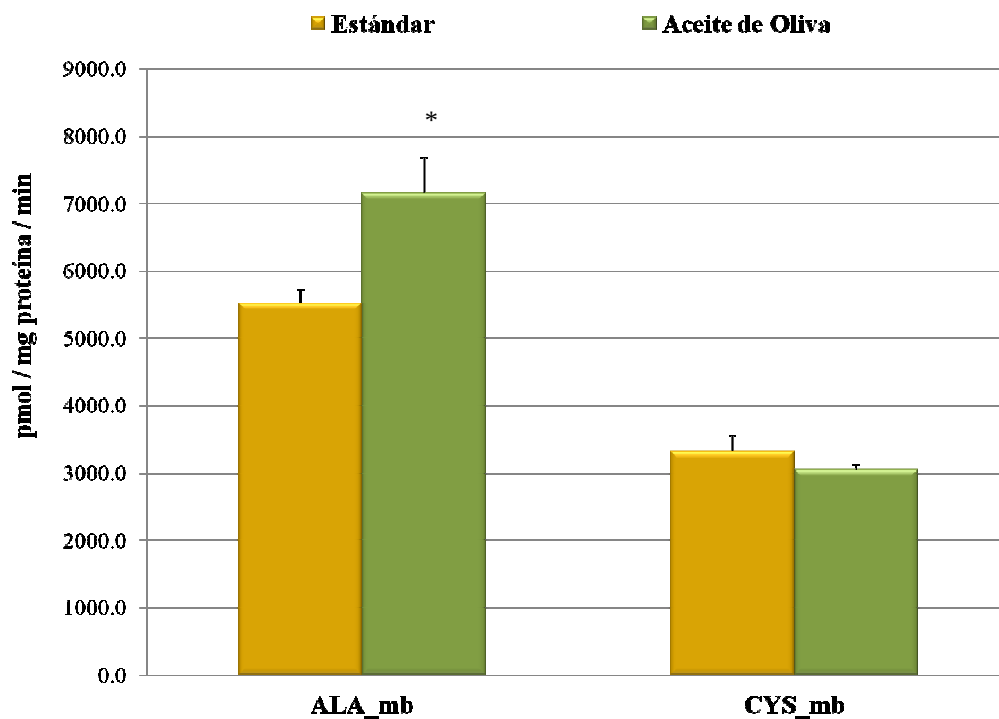
En las gráficas 77 y 78 se representan los valores medios de las actividades Ala, Cys, Glu y AspAP en fracción soluble de corteza renal. En las gráficas 79 y 80 aparecen estas mismas actividades pero para la fracción unida a membrana. Se observa como los cambios en las actividades se localizan exclusivamente en la fracción de membrana, con mayores niveles de actividad Ala y AspAP en el grupo que consumió la dieta de aceite de oliva virgen extra, aunque para esta última actividad no se alcanzó significación estadística.



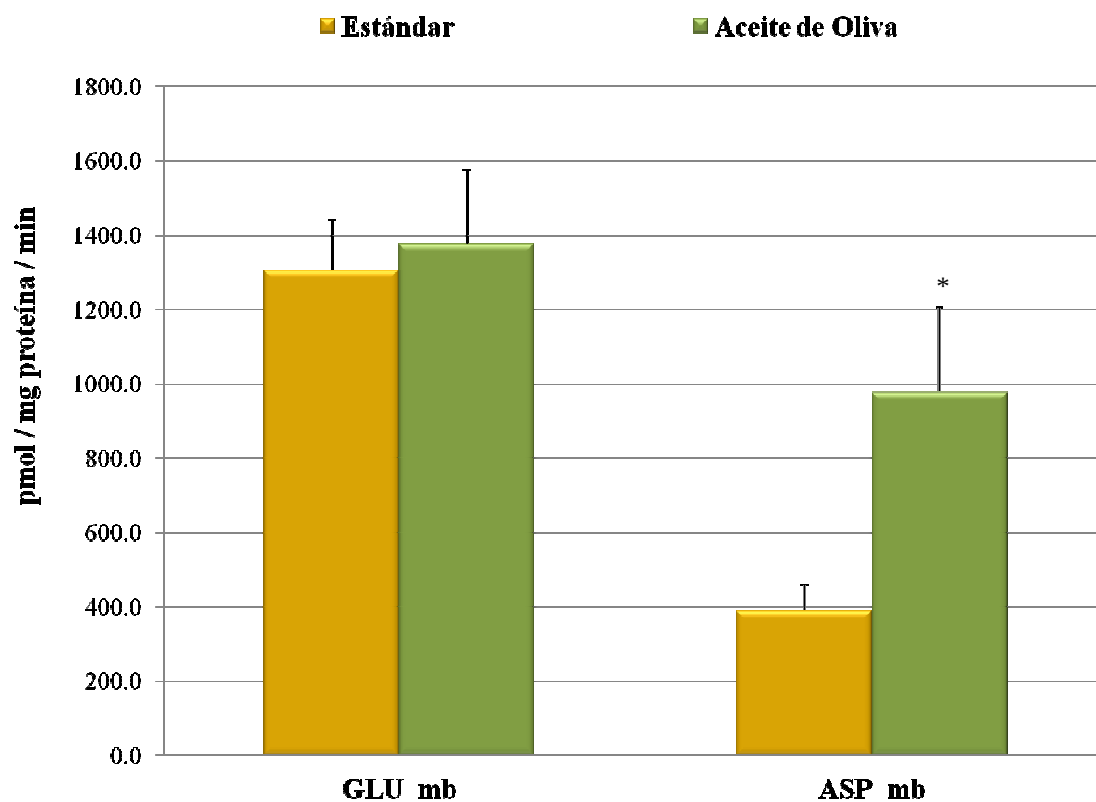
Gráfica 77. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de corteza renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 78. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de corteza renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.

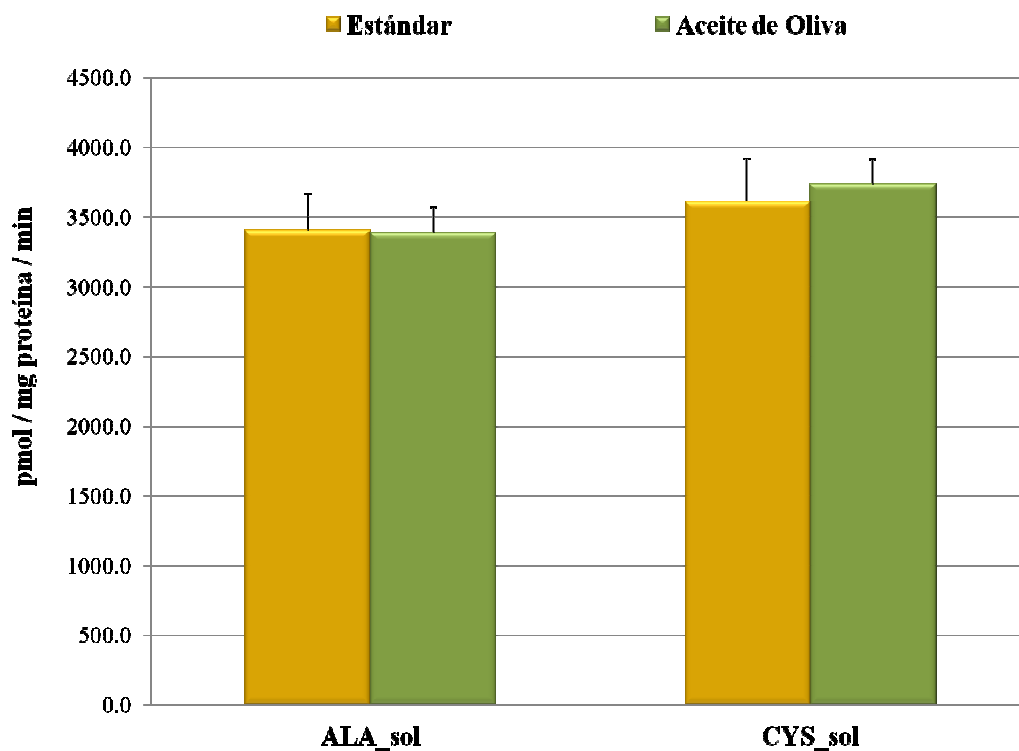


Gráfica 79. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de corteza renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.

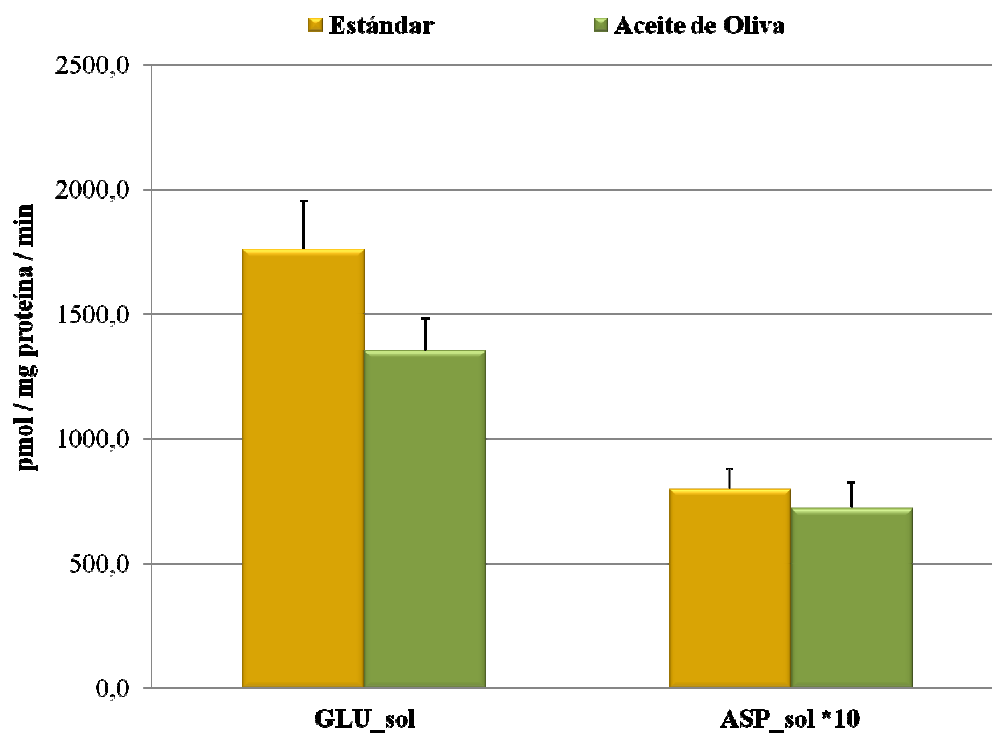


Gráfica 80. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Amino-peptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de corteza renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0,05$.

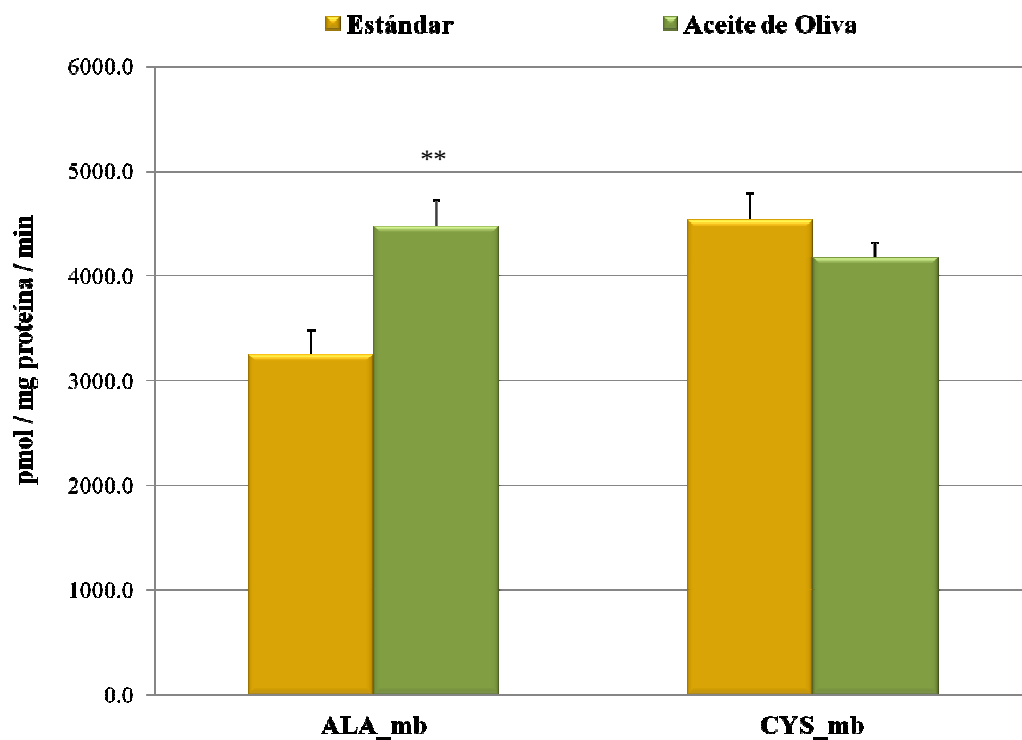
En las Gráficas 81 y 82 se muestran los valores medios para las actividades aminopeptidasas en fracción soluble de médula renal, y en las gráficas 83 y 84 las medias de estas mismas actividades pero en fracción membrana. Al igual que en la corteza, los cambios se localizan en las actividades de membrana. De nuevo detectamos un importante aumento de la actividad AlaAP de membrana, pero sin embargo las actividades Glu y AspAP están disminuidas en el grupo Aceite de Oliva Virgen Extra.



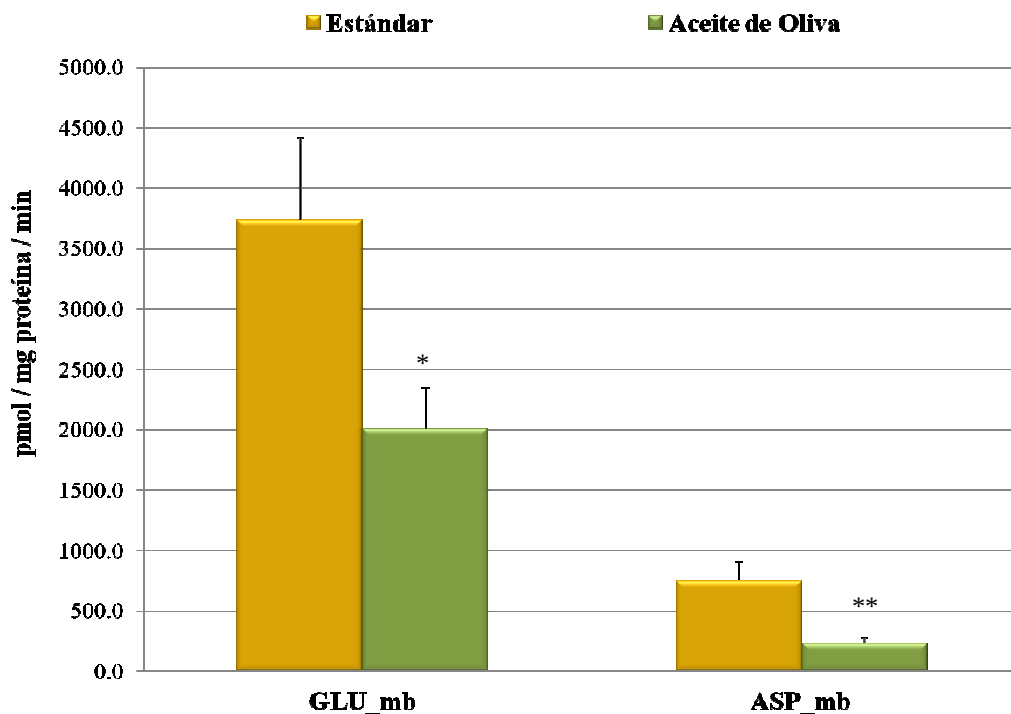
Gráfica 81. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_sol) y Cisteína (CYS_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de médula renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 82. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_sol) y Aspártico (ASP_sol) Aminopeptidasa en la fracción soluble de los homogenizados de médula renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min.



Gráfica 83. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Alanina (ALA_mb) y Cisteína (CYS_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de médula renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Ala- β -NA ó Cys- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: ** p<0,01.



Gráfica 84. Valores medios $\pm$ error estándar de las actividades Glutámico (GLU_mb) y Aspártico (ASP_mb) Aminopeptidasa en la fracción unida a membrana de los homogenizados de médula renal para los grupos Estándar (n=8) y Aceite de Oliva Virgen Extra (n=8), expresados como pmoles de Glu- β -NA ó Asp- β -NA hidrolizados/mg. proteína/min. Se representan las diferencias estadísticamente significativas: *p<0,05; **p<0,01.

Como ya hemos indicado anteriormente, el sistema renina angiotensina intra-renal es regulado de forma independiente al SRA sistémico y juega un papel relevante en el mantenimiento de la hipertensión. De hecho, los niveles de angiotensinas en el riñón son superiores a los del plasma o cualquier otro órgano (Kobori et al. 2007, Velez 2009). La activación de este sistema local en el curso de distintas patologías puede desembocar en fibrosis y daño renal, y la activación intra-renal de este sistema podría ser en parte causa de la hipertensión SHR. También es conocida la relación entre el SRA renal y la nefropatía diabética (Anderson, 1997), aunque poco se sabe de la relación entre el SRA intra-renal y la obesidad (Chung et al., 2010).

Nuestros resultados indican una modificación en las actividades aminopeptidasas en el grupo que consumió el aceite de oliva virgen extra, con un aumento de la actividad AlaAP de membrana tanto en médula como en corteza renal, y una disminución muy significativa de las actividades Glu y AspAP unidas a membrana en la médula. Si tenemos en cuenta que la hipertensión SHR podría estar relacionada con una hiperactividad del SRA renal, los cambios en estas actividades podrían obedecer a modificaciones en las concentraciones de las distintas angiotensinas, y ser reflejo de los menores niveles de presión arterial en estos animales. En concreto, los mayores niveles de actividad GluAP en los animales que recibieron la dieta control podían obedecer a una mayor concentración de AngII, relacionada con la exagerada reacción presora y el menor flujo renal medular descrito en los animales SHR (Liu, 2009).

El aumento de las actividades AlaAP y AspAP en corteza renal podría sugerir un mayor metabolismo de la AngIII a AngIV y una mayor formación de Ang2-10 en los animales que recibieron la dieta enriquecida con aceite de oliva virgen extra. La conversión intraglomerular de AngI a Ang2-10 podría ser crítica para contrarestrar la acción local de la AngII (Velez et al., 2009). Por lo tanto, la dieta enriquecida en aceite de oliva virgen extra podría aumentar la formación glomerular de Ang2-10 y de esa forma contrarestrar los efectos negativos de la AngII.

En la médula renal, el aumento de la actividad AlaAP y el descenso de las actividades GluAP y AspAP indicaría un mayor metabolismo de la AngIII a AngIV, y al mismo tiempo una menor transformación de la AngII en AngIII, prolongando el tiempo de actuación de dicho péptido. Se ha descrito que en la médula la AngII aumenta el transporte de la urea, contribuyendo al aumento de la reabsorción de sodio y agua

(Buns y Li, 2003) lo que estaría de acuerdo con los menores niveles de diuresis observados en este grupo durante gran parte del periodo experimental, sin embargo, esta argumentación contrasta con los menores niveles de PA en dicho grupo.

Los presentes resultados sugieren una respuesta opuesta entre la médula y la corteza renal: mientras que en la corteza los efectos de la AngII serían contrarestandos por la Ang2-10, en la médula estarían potenciados los efectos de la AngII. Por lo tanto, los efectos beneficiosos del aceite de oliva virgen extra sobre el control de la PA podrían ser debidos a otros factores tales como la modificación en las resistencias vasculares o en el gasto cardiaco.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con Captopril (100 mg/Kg/día), administrado con el agua de bebida durante cuatro semanas, provocó en los animales SHR menores valores de Presión Arterial Sistólica, peso total del corazón y del ventrículo izquierdo, así como un aumento en la diuresis. En comparación con el grupo control, al final del periodo experimental no se encontraron diferencias para el peso corporal total, la ingesta de alimento y bebida, el peso del riñón izquierdo, las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico, glucosa, triglicéridos, colesterol total o fracciones HDL y LDL; así como para los niveles de 8-isoprostanos en orina.

2. El análisis de las actividades AlaAP, CysAP, GluAP y AspAP, tras el tratamiento con Captopril, demostró que no existieron diferencias entre grupos para las actividades plasmáticas. En hipotálamo, se observó una disminución en la actividad AlaAP de membrana, pero no se encontraron diferencias para el resto de las actividades, tanto en la fracción soluble como en la unida a membrana. Este resultado podría sugerir un aumento en la disponibilidad de la AngIII y la AngIV. En la corteza y la médula renal se obtuvo una disminución generalizada de las distintas actividades enzimáticas analizadas.

3. El tratamiento con Propranolol (100 mg/Kg/día), administrado con el agua de bebida durante cuatro semanas, provocó en los animales SHR una disminución en el peso corporal total, la ingesta de alimento y bebida y los niveles de 8-isoprostanos en orina; y un aumento de la concentración de triglicéridos en plasma. Al final del periodo experimental no se observaron diferencias con respecto al grupo control para los valores de Presión Arterial Sistólica, peso total del corazón, del ventrículo izquierdo y del riñón izquierdo; ni para los valores de diuresis y las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico, glucosa, colesterol total y fracciones HDL y LDL.

4. El análisis de las actividades AlaAP, CysAP, GluAP y AspAP, tras el tratamiento con Propranolol, demostró al final del periodo experimental un aumento de las actividades GluAP y AspAP en plasma, sin que existieran cambios en las actividades AlaAP y AspAP, lo que podría sugerir un aumento en la formación de AngIII y AngIV. En la corteza renal, excepto para las actividades GluAP y AspAP, el

resto de las actividades tanto solubles como unidas a membrana, disminuyeron tras el tratamiento con Propranolol. En la médula renal se obtuvieron menores niveles de actividad AspAP unida a membrana, pero el resto de las actividades no sufrieron cambios.

5. El tratamiento con L-NAME (70 mg/Kg/día), administrado con el agua de bebida durante cuatro semanas, provocó en los animales SHR un aumento de los valores de Presión Arterial Sistólica, del peso total del corazón y del ventrículo izquierdo, del peso del riñón izquierdo, de los valores de diuresis y de 8-isoprostanos en orina, así como de la concentración de triglicéridos en plasma; y una disminución de los niveles de óxido nítrico en sangre. Sin embargo, no se observaron diferencias para el peso corporal total, la ingesta de alimento y bebida, ni para las concentraciones en plasma de glucosa, colesterol total o fracciones HDL y LDL.

6. El análisis de las actividades AlaAP, Cys, GluAP y AspAP tras el tratamiento con L-NAME demostró al final del periodo experimental, que no existieron diferencias en las actividades de aminopeptidasas en plasma. En hipotálamo, mientras que hubo una disminución en las actividades AlaAP y AspAP unidas a membrana, no se observaron diferencias en el resto de las actividades estudiadas, sugiriendo una mayor disponibilidad de AngIII y AngIV. En la corteza renal, mientras que tuvo lugar una disminución generalizada de las actividades solubles, no se observaron diferencias en la fracción de membrana. En la médula renal, las actividades CysAP y AspAP unidas a membrana también disminuyeron tras el tratamiento con L-NAME, no estableciéndose diferencias para el resto de las actividades. Estos resultados podrían sugerir una mayor disponibilidad de vasopresina en dichas condiciones.

7. Las ratas SHR alimentadas tanto con una dieta estándar como con una dieta enriquecida en Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) mostraron un aumento progresivo de los valores de Presión Arterial Sistólica durante el proceso experimental. Sin embargo, en el grupo AOVE dicho aumento no comenzó hasta la sexta semana de periodo experimental, y durante todo el desarrollo del mismo los valores de Presión Arterial Sistólica fueron siempre menores en el grupo AOVE que en el estándar. Los valores de peso corporal también mostraron un aumento progresivo, sin que aparecieran diferencias entre ambos grupos. No existió un patrón claro de ingesta de alimento,

siendo los valores medios similares en las dos dietas estudiadas. Excepto para las tres primeras semanas, durante la mayor parte del periodo experimental no existieron diferencias en la ingesta de bebida de los dos grupos, sin embargo, la excreción de orina fue menor en el grupo AOVE. En el punto medio del proceso experimental, los valores de óxido nítrico en orina fueron menores en el grupo AOVE, sin que existieran diferencias ni al inicio ni al final del experimento.

8. El grupo experimental que recibió la dieta enriquecida en AOVE mostró, tras las doce semanas de periodo experimental, mayores concentraciones plasmáticas de glucosa, triglicéridos, colesterol total y fracción LDL. El peso del riñón izquierdo y la concentración de 8-isoprostanos en orina fue menor en dicho grupo. No se encontraron diferencias entre los dos grupos experimentales para el peso del corazón y el ventrículo izquierdo, ni para las concentraciones en plasma de óxido nítrico y HDL-colesterol. El test de tolerancia a la glucosa en ayunas, y tras una sobrecarga intraperitoneal, demostró que era necesario mayor tiempo para la recuperación de los valores basales en el grupo AOVE.

9. El análisis de las actividades de aminopeptidasas demostró que no existieron diferencias al final del periodo experimental para las actividades en plasma, hipotálamo y fracción soluble de corteza y médula renal. Sin embargo, las actividades AlaAP y AspAP en la fracción membrana de la corteza renal del grupo AOVE fueron superiores a sus controles, lo que podría sugerir una mayor formación de Ang2-10. En la médula renal, mientras que la actividad AlaAP unida a membrana también aumentó, las actividades GluAP y AspAP unidas a membrana disminuyeron, lo que podría sugerir una mayor disponibilidad de la AngII.

Abreviaturas

8. ABREVIATURAS

A

Ala AP	Alanil Aminopeptidasa
Ang	Angiotensina
AP	Aminopeptidasa
APs	Aminopeptidasas
ArgAP	Arginil Aminopeptidasa
Asp AP	Aspartil Aminopeptidasa
ADP	Adenosina – 5 – difosfato
AG	Ácidos Grasos
ANOVA	Análisis de varianza (del inglés analysis of variance)
ATP	Adenin trifosfato
AChE	Acetilcolinesterasa y acetilcolintransferasa
ADMA	NG – dimetilarginina asimétrica
AP A	Aminopeptidasa A (GluAP)
AGT	Angiotensinógeno
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ARA	Antagonistas de los receptores de la angiotensina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AP M	Aminopeptidasa M
AP N	Aminopeptidasa N
Arg	Arginina
ARC	Núcleo Arcuato
AUC	Área Bajo la Curva (del inglés Area Under Curve)
AOVE	Aceite de Oliva Virgen Extra

B

BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés Bovine serum albumin)
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BH	Balance Hídrico
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico

C

Cys AP	Cisteinil aminopeptidasa
CT	Colesterol Total
CHE	Colesterol esterasa
CHOD	Colesterol oxidasa
CVO	Órganos circunventriculares

CD	Conductos colectores
CMLV	Células musculares lisas vasculares
CE	Células endoteliales
CREB	cAMP response element-binding
CRH	Hormona liberadora de la corticotropina

D

DTT	D-L-Ditiotreitol (del inglés Dithiothreitol)
DMSO	Dimetilsulfóxido (del inglés Dimethyl sulphoxide)
DPP	Dipeptidilpeptidasa
DT	Túbulos distales
DAP	Dihidroxiacetona fosfato

E

ECV	Enfermedades cardiovasculares
EC	Enzyme commission numbers
EDRF	Factor Relajante derivado del endotelio (del inglés Endothelium derived relaxing factor)
ECA	Enzima convertidora de angiotensina (del inglés Angiotensin-converting enzyme)
EDHF	Factor Hiperpolarizante Endotelial (del inglés Endothelium derived hyperpolarizing factor)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida (del inglés solid-phase enzyme immunoassay)
ESH	European Society of Hypertension
ESC	European Society of Cardiology
EE	Error Estándar

F

FR	Factor de Riesgo
FRCV	Factor de Riesgo Cardiovascular
FAD	Flavin Adenin dinucleótido
FDA	Food and Drug Administration
FMN	Flavin Adenin Mononucleótido
FTC	Factores transcripcionales asociados con el crecimiento

G

GC	Gasto Cardíaco
Glu AP	Glutámico Amino-peptidasa

GK	Glicerol Kinasa
GOD	Glucosa Oxidasa
GPO	Glicerol fosfato oxidasa
GTP	Guanosina trifosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GLUT	Transportador de Glucosa (del inglés Glucose transporter)
G3P	Glicerol – 3 – fosfato
GLP-1	Péptido similar al Glucagón tipo 1 (del inglés Glucagon like peptide-1)

H

HTA	Hipertensión arterial
HVI	Hipertrofia ventricular izquierda
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (del inglés High density lipoprotein)
HCMV	Citomegalovirus humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno

I

IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina (del inglés angiotensin-converting enzyme inhibitor)
IL	Interleucina
ICV	Intracerebroventricular
IRAP	Aminopeptidasa regulada por insulina (del inglés insulin-regulated aminopeptidase)
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

L

L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LH	Hipotálamo Lateral
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (inglés Light density lipoprotein)
LPL	Lipoproteinlipasa
Leu	Leucina
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina

M

MUFA	Grasas monoinsaturadas
mmHg	Milímetros de mercurio

N

Na	Naftilamida
NEP	endopeptidasa neutra
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOSn	Óxido nítrico sintasa neuronal (del inglés neuronal nitric oxide synthase)
NOSi	Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés inducible nitric oxide synthase)
NOSe	Óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés endotelial nitric oxide synthase)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaCl	Cloruro Sódico
NF- κ β	Factor nuclear Kappa β

O

OEA	Oleoiletanolamida
OMS	Organización Mundial de la Salud
OFS	Órgano subfornical

P

PA	Presión arterial (del inglés blood pressure)
PAS	Presión Arterial Sistólica
PAD	Presión Arterial Diastólica
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
POD	Peroxidasa
PV	Peso vivo
PVN	Núcleo Paraventricular
PAI_1	Inhibidor del activador del plasminógeno_1 (del inglés plasminogen activator inhibitor_1)
PREDIMED	Prevención con Dieta Mediterránea
PT	Túbulos proximales

R

RP	Resistencia Periférica
RCV	Riesgos cardiovascular
RPR	Pro-renina (del inglés prorenin)
ROS	Especies reactivas del oxígeno

S

SHR	Ratas genéticamente hipertensas (del inglés spontaneously hypertensive rats)
SRA	Sistema renina angiotensina (del inglés Renin-angiotensin system)
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SMC	Células del músculo liso (del ingles smooth muscle cells)

T

TA	Tensión Arterial
TG	Triglicéridos
TGFβ ₁	Factor de crecimiento transformante β (del inglés the transforming growth factor beta)

V

VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés very low light density lipoprotein)
Val	Valina

W

WKY	Ratas normotensas (Wistar-Kyoto)
WHO	World Health Organization

Bibliografía

9. BIBLIOGRAFÍA

Acín S, Navarro MA, Perona JS, Arbonés-Mainar JM, Surra JC, Guzmán MA, Carnicer R, Arnal C, Orman I, Segovia JC, Osada J, Ruiz-Gutiérrez V. Olive oil preparation determines the atherosclerotic protection in apolipoprotein E knockout mice. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(6):418-24.

Aguilera G, Young WS, Kiss A, Bathia A. Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II. *Neuroendocrinology.* 1995 Apr;61(4):437-44.

Alba F, Arenas JC, López MA. Properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidases in the presence of detergents. *Peptides.* 1995; 16:325-9.

Albiston AL, Mustafa T, McDowall SG. AT4 receptor is insulin-regulated membrane aminopeptidase: potential mechanisms of memory enhancement. *Trends Endocrinol. Metab.* 2003; 14 (2): 72–7.

Alemaný R, Perona JS, Sánchez-Dominguez JM, Montero E, Cañizares J, Bressani R, Escribá PV, Ruiz-Gutierrez V. G protein-coupled receptor systems and their lipid environment in health disorders during aging. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:964–975.

Alonso A, Ruiz-Gutiérrez V, Martínez-González MA. Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence. *Public Health Nutrition.* 2006; 9 (2), 251-257.

Ambroz, C., Clark, A. J. L. & Catt, K. J. The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Dec 3;1133(1):107-11.

Anderson S. Role of local and systemic angiotensin in diabetic renal disease. *Kidney Int Suppl.* 1997; 63:S107-10

Arechaga G, Sánchez B, Alba F, Luna JD, Prieto I, Martínez JM, Ramírez M. Developmental changes of soluble and membrane-bound aspartate aminopeptidase activities in rat brain. *Rev Esp Fisiol.* 1996; 52:149-54.

Arechaga G, Martínez JM, Prieto I, Ramírez MJ, Sánchez MJ, Alba F, De Gasparo M, Ramírez M. Serum aminopeptidase A activity of mice is related to dietary fat saturation. *J Nutr.* 2001; 131(4):1177-9.

Arendshorst WJ, Chatziantoniou C, Daniels FH. Role of angiotensin in the renal vasoconstriction observed during the development of genetic hypertension. *Kidney Int* 1990. Suppl.30:S92-6.

Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1977; 74:3203-7.

Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellesmann C, Hansen SH, Hansen HS. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acylethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1781(4):200-12. Epub 2008 Feb 12.

Azcón-Bieto J, Talón M. *Fundamentos de fisiología vegetal.* Ed. McGraw-Hill-Interamericana, 2000; 261-283.

Bader M and Ganten D. Update on tissue renin–angiotensin systems. *J Mol Med.* 2008; 86:615–621.

Baena Díez JM, del Val García JL, Tomás Pelegrina J, Martínez Martínez JL, Martín Peñacoba R, González Tejón I, Raidó Quintana EM, Pomares Sajkiewics M, Altés Boronat A, Álvarez Pérez B, Piñol Forcadell P, Rovira España M, Oller Colon M. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Rev Esp Cardiol.* 2005; 58(4):367-73

Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Durán R, Ramírez M. Brain Aminopeptidases and Hypertension. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2006 Sep;7(3):129-34.

Banegas I, Ramírez M, Alba F, Vives F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Durán R, Prieto I. Papel de las aminopeptidasas en el control neuroendocrino de la presión arterial en animales de experimentación. *Endocrinol Nutr.* 2008; 55(9): 402-8.

Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Duran R, Luna Jde D, Segarra AB, Hermoso F, Ramírez M. Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. *Neuropharmacology*. 2009; 56(3):573-9.

Banegas JR, Rodriguez Artalejo F. El problema de la hipertensión arterial en España. *Rev Clin Esp* 2002; 202 (1):12-5.

Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Ruilope LM, Graciani A, Luque M, de la Cruz-Troca JJ, García-Robles R, Tamargo J, Rey-Calero J. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J Hypertens*. 2002; 20:2157-64.

Banegas, J.R. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. *Hipertensión*. 2005; 22(9):353-62.

Banerjee M, Kang KH, Morrow JD, Roberts LJ, Newman JH. Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-PGF 2 α , in rabbit lung in situ. *Am. J. Physiol*. 1992; 263, H660-H663.

Benter IF, Diz DI, Ferrario CM. Cardiovascular actions of angiotensine (1-7) Peptides. *Hypertension* 1993; 14: 674-84.

Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. Angiotensin (1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290 (2): H684-91.

Benter IF, Yousif MH, Al-Saleh FM, Raghupathy R, Chappell MC, Diz DI. Angiotensin-(1-7) blockade attenuates captopril- or hydralazine-induced cardiovascular protection in spontaneously hypertensive rats treated with NG-nitro-L-arginine methyl ester. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011; 57(5):559-67.

Bermudez B, Lopez S, Ortega A, Varela LM, Pacheco YM, Abia R, Muriana FJ. Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Curr Pharm Des*. 2011. 17(8):831-43.

Bernátová I, Kopincová J, Púzserová A, Janega P, Babál P. Chronic low-dose L-NAME treatment increases nitric oxide production and vasorelaxation in normotensive rats. *Physiol. Res*. 2007; 56. Suppl. 2: S17-S24.

Bodineau L, Frugière A, Marc Y, Claperon C, Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as centrally acting antihypertensive agents. *Heart Fail Rev.* 2008 Sep;13(3):311-9. Epub 2008 Jan 3.

Boskou, D. Composición del Aceite de Oliva. Química y tecnología del aceite de oliva, Boskou, D. (Ed.). AMV Ediciones, 1998; 67-103.

Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59(3):373-84.

Breckenridge A. Angiotensin converting enzyme inhibitors. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1988 Feb 27;296(6622):618-20.

Burns KD, Li N. The role of angiotensin II-stimulated renal tubular transport in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5:165-171.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2007; 15(4):798-808.

Cabrera CL, Bealer SL, Bohr DF. Central depressor action of nitric oxide is deficient in genetic hypertension. *Am J Hypertens.* 1997, 9: 237–241.

Calabresse, G. Efectos del aceite de oliva virgen extra beneficiosos para la salud. *Olivae*, 2002; 93; 19-20.

Cancelas J, Prieto PG, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Effects of an olive oil-enriched diet on glucagon-like peptide 1 release and intestinal content, plasma insulin concentration, glucose tolerance and pancreatic insulin content in an animal model of type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2006 Feb;38(2):98-105.

Cao P, Ito O, Guo Q, Ito D, Muroya Y, Rong R, Mori T, Ito S, Kohzuki M. Endogenous hydrogen peroxide up-regulates the expression of nitric oxidesynthase in the kidney of SHR. *J Hypertens.* 2011 Jun;29(6):1167-74.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin–angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003; 24: 261 – 271.

Caruso-Neves C, Lara L, Rangel L, Grossi A, Lopes A. Angiotensin (1-7) modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1467: 189- 197.

Castro del Pozo, S. Manual de Patología General. Etiología-Fisiopatología-Semiología-Síndromes. 2001. Capítulo 25. Fisiopatología de la Presión Arterial, páginas 189-194.

Cerrato BD, Frasca AP, Nakagawa P, Longo-Carbajosa N, Peña C, Höcht C, Gironacci MM. Angiotensin-(1-7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2012; 1453:1-7.

Cert A, Moreda W, García-Moreno J. Determinación de esteroides y alcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y aceites* 1999; 48:207-218.

Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(21):2728-37.

Cheng HF, Wang JL, Vinson GP, Harris RC. Young SHR express increased type 1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol.* 1998; 274 (1 Pt 2) F10-7.

Cheung BMY. Blockade of the rennin-angiotensin system. *Hong Kong Medical Journal* 2002; v. 8; n 3; p. 185-191.

Cheung HS, Cushman DW. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta* 1971; 242:190–193.

Chung O, Csikó T, Unger T. Angiotensin II receptor pharmacology and AT1 receptor blockers. *J Hum Hypertens* 1999; 13 Suppl (1): S11-S20.

Chung S, Park CW, Shin SJ, Lim JH, Chung HW, Youn DY, Kim HW, Kim BS, Lee JH, Kim GH, Chang YS. Tempol or candesartan prevents high-fat diet-induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Feb;25(2):389-99.

Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1995; 91 (1): 161–70.

Contreras F, Terán L, Barreto N, de la Parte M, Simonovis N, Velasco M. Aspectos Funcionales del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona y Bloqueantes de los Receptores AT1 de Angiotensina II en Hipertensión Arterial. 2000; vol.19 no.2.

Covas MI. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*. 2007; 55; 175-186.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; 20, 417: 822-8.

Cruz Mérida A. León Hernández, FJ; Hernández, H. Regulación normal de la presión arterial sistémica. *Revista Mexicana de Cardiología*. 2004; Vol. 15: 30 - 41.

Cutler JA, Davis BR. Thiazide-type diuretics and beta-adrenergic blockers as first-line drug treatments for hypertension. *Circulation*. 2008; 117(20):2691-704.

Danziger RS. Aminopeptidases N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev* 2008; 13:293-298

Darga LL, Hakim MJ, Lucas CP, Franklin BA. Comparison of the effects of guanadrel sulfate and propranolol on blood pressure, functional capacity, serum lipoproteins and glucose in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1991;67:590-596.

Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdos EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* 1998; 31, 912-917.

DeBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):340-9.

De Gasparo M, Whitebread S, Mele M, Motani AS, Whitcombe PJ, Ramjouw HP, Kamber B. Biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 (Suppl 4): S31-5.

De Gasparo M, Rogg H, Brink M, Wang L, Whitebread S, Bullock G, Erne P. Angiotensin II receptor subtypes and cardiac function. *Eur Heart J*. 1994; 15(Suppl 1D):98 -103.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000. Sep; 52(3): 415-72.

De Gasparo M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev*. 2002; 7(4):347-58.

De Gasparo M, Hess P, Clozel M, Persohn E, Roman D, Germann PG, Clozel JP, Webb RL: Combination of low-dose valsartan and enalapril improves endothelial dysfunction and coronary reserve in Nomega-nitro- L -arginine methyl ester-treated spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40: 789–800.

De Kloet AD, Krause EG, Kim DH, Sakai RR, Seeley RJ, Woods SC. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition using captopril on energy balance and glucose homeostasis. *Endocrinology*. 2009 Sep;150(9):4114-23. Epub 2009 Jun 4.

De Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav.*, 2010; 100(5):525-34

De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular tubular interaction in the rat. *J Clin Invest* 1992; 89: 1248-56.

De Wardener HE. The hypothalamus and hypertension. *Physiol. Rev*. 2001; 81: 1599–658.

Denke M.A. Determinantes dietéticos de los niveles de colesterol ligados a lipoproteínas de alta densidad. *Cardiovascular Risk Factor (Ed. Esp.)*, 1993: 2 Supl. 2: 51-57.

Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE)

Dostal DE. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: A localized renin angiotensin system in neonatal rat. *Am J Physiol* 1992; 263: 838-850.

Dzau VJ, RE R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: A paradigm shift. *Circulation* 1994; 8(1); 493-498.2

Engler MM, Schambelan M, Engler MB, Ball DL, Goodfriend TL. Effects of dietary gamma-linolenic acid on blood pressure and adrenal angiotensin receptors in hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998; 218(3):234-7.

Ernsberger P, Johnson JL, Rosenthal T, Mirelman D, Koletsky RJ. Therapeutic actions of allylmercaptocaptopril and captopril in a rat model of metabolic syndrome. *Am J Hypertens*. 2007; 20(8):866-74.

Escalante B. Importancia biológica del receptor de angiotensina II (AT₂). *Archivos de Cardiología de México*. 2004; Volumen 74 núm. 2. S284-S286

Esposito K, Marfella R, Ciotola M, di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA* 2004, 292:1440-1446.

Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006; 145(1):1-11.

Fernández O, Wangenstein R, Osuna A, Vargas F. Renal vascular reactivity to P(2) purinoceptor activation in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*. 2000 Jan;60(1):47-50.

Ferrara LA, Raimondi AS, D'Espiscopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med.* 2000; 160:837-842

Ferrario CM. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin (1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* 2006; 47: 515-21.

Ferrer Viant D, Fonseca JC, García Rodríguez RE. Óxido Nítrico: Importancia Biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y Hematológicas. *Medison* 1998; 2 (3): 45-53.

Fontes MA, Silva LC, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Guertzenstein PG, Santos RA. Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors. *Brain Res.* 1994 Nov 28;665(1):175-80.

Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts LJ, Reckelhoff JF. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2003; 41:640-5.

Fruitier Arnaudin I, Cohen M, Bordenave S, Sannier F, Piot J. Comparative effects of angiotensin IV and two hemorphins on angiotensin-converting enzyme activity. *Peptides*, 2002; 23: 1465-70.

Fuentes F, López-Miranda J, Sánchez E, Sánchez F, Paez J, Paz-Rojas E, Marín C, Gómez P, Jimenez-Perepérez J, Ordovás JM, Pérez-Jiménez F. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Ann Intern Med* 2001; 134:1115–1119.

Funakawa S, Itoh T, Nakamura M, Tochino Y. Age related changes of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and L-alanine aminopeptidase in mouse kidney, urine and plasma. *Life Sci.* 1987 Mar 23;40(12):1193-9.

Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:273-276.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin – angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; 264(3):224-36.

Gaetani S, Fu J, Cassano T, Dipasquale P, Romano A, Righetti L, Cianci S, Laconca L, Giannini E, Scaccianoce S, Mairesse J, Cuomo V, Piomelli D. The fat-induced satiety factor oleoylethanolamide suppresses feeding through central release of oxytocin. *J Neurosci.* 2010 Jun 16;30(24):8096-101.

Ganten D, Boucher R, Genest J. Renin activity in brain tissue of puppies and adult dogs. *Brain Res.* 1971 Oct 29;33(2):557-9.

Gelband CH, Sumners C, Lu D, Raizada MK. Angiotensin receptors and norepinephrine neuromodulation: Implications of functional coupling. *Regul. Pept.* 1998; 73: 141-7.

Gilani AH, Khan AU, Shah AJ, Connor J, Jabeen Q. Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2005; 56: 613-620.

Gillies LK, Werstiuk ES, Lee RMKW. Cross-over study comparing effects of treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II type 1 receptor antagonist on cardiovascular changes in hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:477-486.

Glenner GG, McMillan DJ, Folk JE. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alfa-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 1962; 194:867.

Goldberg MR, Bradstreet TE, McWilliams EJ, Tanaka WK, Lipert S, Bjornsson TD, Waldman SA, Osborne B, Pivadori L, Lewis G. Biochemical effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients. *Hypertension* 1995; 25:37-46.

Graham S, Gamie Z, Polyzois I, Tsiridis E, Tsiridis E. The effect of beta-blockers on bone metabolism as potential drugs under investigation for osteoporosis and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008; 17(9):1281-99.

Greenberg LJ. Fluorimetric measurement of alkaline phosphatase and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochem Biophys Res Commun.* 1962; 9:430-5

Grobe JL, Rahmouni K, Liu X, Sigmund CD. Metabolic rate regulation by the renin-angiotensin system: brain vs. body. *Pflugers Arch. European Journal of Physiology* 2012.

Guía Española de Hipertensión Arterial. 2005. Capítulo 2. Hipertensión arterial. Definición. Epidemiología, 22 suplemento 2:3-8

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiología médica. Décima edición. McGraw Hill 2001. Cap 18 y 19; pags 223-252.

Haithcock D, Jiao H, Cui X-L, Hopfer U, Douglas J. Renal proximal tubular AT2 receptor: signaling and transport. J Am Soc Nephrol 1999; 10: S69–S74.

Harwood J, Aparicio R. Handbook of olive oil, Analysis and Properties: Kluwer Academic Publishers, 2000.

Healy DP, Song L. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part I: spontaneously hypertensive rats. Hypertension 1999. 33(2):740-5.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. Angiotensin-(1-7)–stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. Hypertension. 2001; 37: 72–76.

Herrera MD, C. Perez-Guerrero, E. Marhuenda, V. Ruiz-Gutierrez, Effects of dietary oleic-rich oils (virgin olive and high-oleic-acid sunflower) on vascular reactivity in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats, Br. J. Nutr. 86 (2001) 349–357.

Hertting G. and Meyer D.K. Effect of converting enzyme blockade on isoprenaline- and angiotensin I-induced drinking. Br J Pharmacol. 1974 November; 52(3): 381–386.

Hsieh NK, Wang JY, Liu JC, Wang SD, Chen HI. Nitric oxide inhibition accelerates hypertension and induces perivascular inflammation in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 2004; 31: 212-218.

Hu WY, Chen DG, Chen SC, Jin XQ, Wang HJ. Effect of chronic captopril treatment on circulating and tissue renin-angiotensin system in SHR rats. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1996; 17: 507-512.

Hurwitz S, Cohen R, Williams GH. Diurnal variation of aldosterone and plasma renin activity: timing relation to melatonin and cortisol and consistency after prolonged bed rest. J Appl Physiol 2004; 96: 1406-1414.

Ikeda U, Hyman R, Smith TW, Medford RM. Aldosterone-mediated regulation of Na⁺, K⁺-ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. *J Biol Chem.* 1991;266:12058–12066.

Ingelfinger J, Jung F, Diamont D, Havervan L, Lee E, Brem A, Tang S-S. Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40DNA: autocrine ANG II feedback. *Am J Physiol* 1999; 276: F218–F227.

Isabelle M, Simonet S, Ragonnet C, Sansilvestri-Morel P, Clavreul N, Vayssettes-Courchay C, Verbeuren TJ. Chronic reduction of nitric oxide level in adult spontaneously hypertensive rats induces aortic stiffness similar to old spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* 2012;49(4):309-18. Epub 2012 May 9.

Jansen H, Baggen RG. Effects of doxazosin and Propanolol administration on lipoprotein lipases in cholesterol-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987;10 Suppl 9:S16-20.

Jin X, Siragy H, Carey R. Renal interstitial guanosine cyclic 3',5'- monophosphate induces natriuresis by a direct tubule mechanism. *Hypertension* 2001; 38: 309–316.

Jiménez J, Rondón D, Martínez L, Mataix J. Composición química de los aceites de oliva, en Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario, ED. Universidad de Granada-Puleva Food, 2001; 115-136.

Jones PJ, Macdougall DE, Nitianos F, Vanstone CA. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 75: 217-227.

Jordan J, Tank J, Stoffels M, Franke G, Christensen NJ, Luft FC, Boschmann M. Interaction between beta-adrenergic receptor stimulation and nitric oxide release on tissue perfusion and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2803-10.

Jover B, Mimran A. Nitric oxide inhibition and renal alterations. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 38 Suppl 2:S65-70.

Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obes Rev.* 2012; 13(2):136-49.

Karamyan VT, Speth RC. Enzymatic pathways of the brain renin-angiotensin system: unsolved problems and continuing challenges. *Regul Pept.* 2007 Oct 4;143(1-3):15-27. Epub 2007 Mar 30.

Keller SR. The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. *Front Biosci.* 2003 May 1; 8:s410-20.

Kim S, Soltani-Bejnood M, Quignard-Boulange A, Massiera F, Teboul M, Ailhaud G, Kim JH, Moustaid-Moussa N, Voy BH. The adipose renin-angiotensin system modulates systemic markers of insulin sensitivity and activates the intrarenal renin-angiotensin system. *J Biomed Biotechnol.* 2006; 2006(5):27012.

Kiritsakis A, Markakis P. Olive oil: a review. *Adv. Food Res.* 1987. 31: 453-482.

Kiss A, Jurkovicova D, Jezova D, Krizanova O. Changes in angiotensin AT1 receptor mRNA levels in the rat brain after immobilization stress and inhibition of central nitric oxide synthase. *Endocr Regul.* 2001;35(2):65-70.

Kitami Y, Hiwada K, Kokubu T. Kidney renin gene expression in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1989; 7(9):727-31.

Klemola R, Huttunen P, Laine M, Weckström M, Hirvonen J. Catecholamines in pericardial fluid of normotensive, spontaneously hypertensive and reserpine-treated rats. *Acta Physiol Scand.* 1999 Mar; 165(3):293-7.

Kobori H, Nishiyama A, Harrison-Arrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal angiotensin status in hypertension. *Hypertension* 2003; 41:42–49.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007; 59(3):251-87.

Kobori H, Ozawa Y, Satou R, Katsurada A, Miyata K, Ohashi N, Hase N, Suzaki Y, Sigmund CD, Navar LG. Kidney-specific enhancement of ANG II stimulates endogenous intrarenal angiotensinogen in gene-targeted mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293:F938–F945

Kojsová S, Jendeková L, Zicha J, Kunes J, Andriantsitohaina R, Pechánová O. The effect of different antioxidants on nitric oxide production in hypertensive rats. *Physiol Res* 2006 55. Suppl 1: S3-S16.

Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, Tziros C, Chmielinska JJ, Mak IT, Weglicki WB. d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012; 90:1257-1268.

Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Jon Aster, MD. «Ch.11 Hypertensive vascular disease». En Saunders (Elsevier). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (8th edición). 2009; ISBN 978-1-4160-3121-5.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007; 18(5):208-14.

Kundu S, Rao JP. The story of spontaneously hypertensive rat (SHR): A Review. *J Med Sci* 2008; 1 (1):65-66.

Lahera V, Navarro-Cid J, Cachofeiro V, García Estaño J, Ruilope LM. Nitric oxide, the kidney and hypertension. *Am.J. Hypertens* 1997; 10:129-140.

Landmesser U, Drexler H. Endothelial function and hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2007; 22:316-320.

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol*. 1997 Oct;18(4):383-439.

Li DP, Chen SR, Pan HL. Angiotensin II stimulates spinally projecting paraventricular neurons through presynaptic disinhibition. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5041-9.

Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilatation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension* 1997; 29: 394-400.

Li Z, Ferguson AV. Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *Am J Physiol*. 1993 Aug; 265 (2 Pt 2):R302-9.

Liu KL. Regulation of renal medullary circulation by the renin-angiotensin system in genetically hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*.2009; 36(5-6):455-61.

Liu Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, Matsumura K, Abe I, Fujishima M. Central and peripheral mechanisms involved in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Hypertens*. 1998; 16:1165-1173.

LLabata Carabal P, Carmona Simarro JV. Educación para la Salud: Hipertensión Arterial. *Epidemiología. Enfermería en Cardiología* 2005; núm. 35 / 2º Cuatrimestre.

Llorens S, Fernández AP, Nava E. Cardiovascular and renal alterations on the nitric oxide pathway in spontaneous hypertension and ageing. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007; 37(1-2):149-56.

Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*. 1996; 47:365-75.

Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest*. 1989 April; 83(4): 1299–1307.

Lovejoy JC. The influence of dietary fat on insulin resistance. *Curr Diab Rep*. 2002 Oct;2(5):435-40.

Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Current Medicinal chemistry* 2007; 14:639-647.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, Williams B; Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension; European Society of Cardiology. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of

Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2007 Jun; 25(6):1105-87.

Mauer Díaz K, Exaire Murad JE, Escalante Acosta BA. Importancia de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en la circulación coronaria. *Archivos de Cardiología de México*. 2001; Volumen 71, núm. 4. 278-285

Marc Y, Llorens-Cortes C. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. *Prog Neurobiol*. 2011; 95(2):89-103.

Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F. Arginine, nitric oxide and endothelial function. *Ars Pharm* 2004; 45 (4): 303-317.

Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A. The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: Monounsaturated fats, olive oil, red wine, or the whole pattern? *Eur J Epidemiol* 2004; 19:9–13.

Matsumoto H, Nagasaka T, Hattori A, Rogi T, Tsuruoka N, Mizutani S, Tsujimoto M. Expresión of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase in neuronal cells and its action on neuronal peptides. *Eur J Biochem* 2001; 268:3259-3266.

Mathai ML, Chen N, Cornall L, Weisinger RS. The role of angiotensin in obesity and metabolic disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011; 11(3):198-205.

McMahon EG. Recent studies with eplerenone, a novel selective aldosterone receptor antagonist. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(2):190-6.

Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vázquez CM. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2010; 632(1-3):65-72.

Millat LJ, Abdel-Rahmanem, Siragy HM. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul. Pept*. 1999. 81:1-10.

Mizutani S, Ishii M, Hattori A, Nomura S, Numaguchi Y, Tsujimoto M, Kobayshi H, Murohara T, Wright JW. New insights into the importance of aminopeptidase A in hypertension. *Heart Fail Rev*. 2008. 13: 273-84.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun; 43(2):109-42.

Montedoro GF, Taticchi A, Esposto S, Selvaggini R, Urbani S, Servilli M. Antioxidants in virgin olive oil. *Olea* 2007; 26:5-13.

Moloney F, Yeow TP, Mullen A, Nolan JJ, Roche HM. Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2004 Oct;80(4):887-95.

Morimoto S, Cassell MD, Beltz TG, Johnson AK, Davisson RL, Sigmund CD. Elevated blood pressure in transgenic mice with brain-specific expression of human angiotensinogen driven by the glial fibrillary acidic protein promoter. *Circ Res* 2001; 89:365–372

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N. Engl. J. Med* 1995; 332, 1198-1203.

Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, Dechend R, Mervaala E, Hampich F, Fiebeler A, Ju X, Finckenberg P, Theuer J, Viedt C, Kreuzer J, Heidecke H, Haller H, Zenke M, Luft FC. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II induced renal damage. *Am. Journal Pathol.* 2002; 161:1679-1693.

Nagata S, Kato J, Kuwasako K, Asami M, Kitamura K. Plasma and tissue concentrations of proangiotensin-12 in rats treated with inhibitors of the renin-angiotensin system. *Hypertens Res.* 2012 Feb;35(2):234-8.

Nagatsu T, Kato T, Numata Y, Keiko I, Umezawa H. Serum dopamine beta-hydroxylase activity in developing hypertensive rats. *Nature.* 1974; 251(5476):630-1.

Nava, E. Disfunción del endotelio, riñón e hipertensión arterial. *Nefrologia.* 1998; Vol. XVIII. Suplemento 1.

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

Navarro J, Sanchez A, Sáiz J, Ruilope LM, García-Estañ J, Romero JC, Moncada S, Lahera V. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hipertensión induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol.* 1994;267:R1516-1521.

Nishiyama A, Seth D, Navar L. Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats. *Hypertension* 2002; 39: 129–134.

Nguyen T, El Salibi E, Rouleau JL. Reduced periinfarction mortality as a result of long-term therapy with captopril but not hydralazine or Propanolol in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32(6):884-95.

O'Shaughnessy KM. The genetics of essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 51(1):5-11.

Okamoto, A. K and Aoki, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Jap Circ J* 1963; 27: 282–293.

Oliveira SA Jr, Okoshi K, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DH, Martinez PF, Okoshi MP, Padovani CR, Pai-Silva MD, Cicogna AC. Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 93(5):526-33.

Olszewski PK, Klockars A, Schiöth HB, Levine AS. Oxytocin as feeding inhibitor: maintaining homeostasis in consummatory behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010 Nov;97(1):47-54. Epub 2010 Jun 2.

Orange SJ, Ledingham JM, Lavery R. Cardiovascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition in genetically hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:488-493.

Oudot A, Behr-Roussel D, Compagnie S, Caisey S, Le Coz O, Gorny D, Alexandre L, Giuliano F. Endothelial dysfunction in insulin-resistant rats is associated with oxidative stress and COX pathway dysregulation. *Physiol Res* 2009; 58(4):499-509.

Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem Toxicol* 2000; 38:647-59.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Würtele G, Spiegelhalter B, Bartsch H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000; 1:107-12.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333(6174):664-6.

Panda K, Rosenfeld RJ, Ghosh S, Meade AL, Getzoff ED, Stuehr DJ. Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III. *J Biol Chem* 2002; 277:31020-31030.

Panza JA, García CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91:1732-1738.

Pastellín Hernández G, Del Valle Mondragón L, Tenorio López FA, Torres Narváez JC. Participación del Óxido Nítrico en la fisiopatología cardiovascular. *Gac Méd Méx* 2007; 143(5): 406-408.

Paulis L, Zicha J, Kunes J, Hojná S, Behuliak M, Celec P, Kojsová S, Pechánová O, Simko F. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res* 2008; 31: 793-803.

Pérez-Martínez J, Delgado-Lista J, López-Segura F, Pérez- Jiménez F. Aceite de oliva y prevención cardiovascular: más que una grasa. *Clin Invest Arterioscl* 2006; 18:195-205.

Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2006; (17) 429-445

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104:191-196.

Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardio-vasc Res* 1998; 39(1):77– 88.

Plavnik FL, Ajzen SA, Christofalo DM, Barbosa CS, Kohlmann O. Endothelial function in normotensive and high-normal hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 2007; 21:467-472.

Pocovi M, Cenarro A, Civeira F. Algunos aspectos antiaterogénicos y beneficiosos de la HDL. *Clin. Invest. Arteriosclerosis*, 1998; vol.10; 6: 303-309.

Porter JP, Potratz KR. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Aug;287(2):R422-8. Epub 2004 Apr 29.

Porter JP, Anderson JM, Robison RJ, Phillips AC. Effect of central angiotensin II on body weight gain in young rats. *Brain Res*. 2003 Jan 3;959(1):20-8.

Prieto I, Martínez JM, Hermoso F, Ramírez MJ, De Gasparo M, Vargas F, Alba F, Ramírez M. Effect of valsartan on angiotensin II and vasopressin-degrading activities in the kidney of normotensive and hypertensive rats. *Horm Metab Res*. 2001; 33(9):559-63

Prieto I, Hermoso F, De Gasparo M, Vargas F, Alba F, Segarra AB, Banegas I, Ramírez M. Angiotensinase activities in the kidney of renovascular hypertensive rats. *Peptides* 2003; 24, 755–760.

Prieto PG, Cancelas J, Moreno P, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, Valverde I. Effects of diet supplementation with olive oil and guar upon fructose-induced insulin resistance in normal rats. *Endocrine*. 2007 Jun; 31(3):294-9.

Prieto PG, Cancelas J, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. Effects of an olive oil-enriched diet on plasma GLP-1 concentration and intestinal content, plasma insulin concentration, and glucose tolerance in normal rats. *Endocrine*. 2005 Mar; 26(2):107-15.

Priviero F, Teixeira CE, Claudino MA, Zanesco A, Antunes E. Vascular effects of long-term Propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. *Eur J Pharmacol*. 2007; 571, 189-196.

Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(4):1012-8.

Qadri F, Arens T, Schwarz EC, Häuser W, Dendorfer A, Dominiak P. Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertens*. 2003; 21(9):1687-94.

Quesada A, Vargas F, Montoro-Molina S, O'Valle F, Rodríguez-Martínez MD, Osuna A, Prieto I, Ramírez M, Wangenstein R. Urinary aminopeptidase activities as early and predictive biomarkers of renal dysfunction in cisplatin-treated rats. *PLoS One*. 2012;7(7):e40402. Epub 2012 Jul 5.

Rabelo LA, Alenina N, Bader M. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertens Res*. 2011 Feb;34(2):154-60. Epub 2010 Dec 2.

Rabin, M., Birnbaum, D., Young, D., Birchmeier, C., Wingler, M. & Ruddle, F. H. Human *ros1* and *mas1* oncogenes located in regions of chromosome 6 associated with tumor-specific rearrangements. *Oncogene Res*. 1987 Jul;1(2):169-78.

Raederstorff D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *Int J Vitam Nutr Res*. 2009; 79(3):152-65.

Raizada MK, Lu D, Tang W, Kurian P, Sumners C. Increased angiotensin II type I receptor gene expression in neuronal cultures from spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 1993; 132(4): 1715-1722.

Ramadan A, Hammoud, Christopher S, Vaccari, Sameer H, Nagamia, Bobby, Khan. Regulation of the rennin-angiotensin system in coronary atherosclerosis: A review of the literature. *Vascular Health and Risk Management* 2007; 3 (6) 937-945.

Ramírez M, Sánchez B, Aréchaga G, Lardelli P, Venzon D, García S, Ozaita A, de Gandarias JM. Daily rhythm of aspartate aminopeptidase activity in the retina, pineal gland and occipital cortex of the rat. *Neuroendocrinology*. 1992; 56:926-9.

Ramírez M, Prieto I, Banegas I, Segarra AB, Alba F. Neuropeptides: Methods and Protocol. *Methods Mol Biol*. 2011; 789:287-94.

Rang HP. M.M. Dale; J.M. Ritter; P.K. Moore. *Farmacología* 5º Edición Elsevier. 2004. Cap.18 pág 285-305.

Ramírez M, Prieto I, Alba F, Vives F, Banegas I, De Gasparo M. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Fail Rev* 2008; 13:339–353.

Ramírez M, Segarra AB, Banegas I, Prieto I. Angiotensinase Activity and Blood Pressure Control in Hypothalamus after Sympathetic β Receptor Blockade. XIII meeting of the Spanish Society of Neuroscience. Tarragona, September 16-19, 2009.

Ramírez M, Segarra AB, Villarejo AB, Banegas I, Wangenstein R, Vives F, Prieto I. Angiotensinase Activity in Hypothalamus and Plasma of Hypertensive rats after Sympathetic β -Receptor Blockade. 8th IBRO CONGRESS, 14-18 July, 2011, Florence, Italy.

Réaux A, de Mota N, Zini S, Cadel S, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortès C. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, induces vasopressin release by increasing the half-life of brain angiotensin III. *Neuroendocrinology*. 1999; 69(5):370-6.

Réaux A, Iturrioz X, Vazeux G, Fournié Zaluski, David C, Roques BP, Corvol P, Llorens Cortés. Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure *Biochem Soc Trans*. 2000; 28 (4): 435-40.

Réaux A, Fournie-Zaluski MC, Llorens-Cortes C. Angiotensin III: A central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12:157–162.

Reckelhoff JF, Granger JP. Role of androgens in mediating hypertension and renal injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26:127–31.

Rettig R, Schmitt B, Pelzl B, Speck T. The kidney and primary hypertension: contributions from renal transplantation studies in animals and humans. *J Hypertens*. 1993; 11:883–891

Risérus U. Fatty acids and insulin sensitivity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Mar;11(2):100-5.

Rivera M, Contreras F, Vázquez J, Velasco M. Disfunción endotelial en hipertensión arterial. *Rev Fac Med* 1999; 22 (2): 101-108.

Robrwasser A, Morgan R, Dillon H, Zhao L, Callaway C, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Teveros D, Lalouel J. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 1999; 34: 1265–1274

Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker PL. Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*. 2001 Mar;142(3):1148-55.

Rodriguez-Rodriguez R, Perona JS, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V. Triterpenic compounds from "orujo" olive oil elicit vasorelaxation in aorta from spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*. 2006 Mar 22; 54(6):2096-102.

Rodriguez-Rodriguez R, Herrera MD, de Sotomayor MA, Ruiz-Gutiérrez V. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens* 2007; 20:728–734.

Ronda Laín E, Ronda Cavallere E, Ronda Cavallere J. Ácidos Grasos Poliinsaturados, en Jornadas Científicas sobre Nutrición y salud Humana, Ministerio de Sanidad y Consumo, 1990; 89-150.

Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, Lozano A, Gómez P, Jiménez Y, Pérez Jiménez F. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2005; 46:1864-8.

Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJ, Guerrero A, Cert AM, Villar J. Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids, and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources. *J Hypertens* 1996; 14:1483–1490.

Ruiz-Gutierrez V, Vazquez CM, Santa-Maria C. Liver lipid composition and antioxidant enzyme activities of spontaneously hypertensive rats after ingestion of dietary fats (fish, olive and high-oleic sunflower oils). *Biosci Rep* 2001; 21(3):271-285.

Safar M, Chamiot-Clerc P, Dagher G, Renaud JF. Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2001 Dec 1; 38(6):1416-21.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007 Jan; 49(1):185-92.

Sanada S, Kitakaze M, Node K, Takashima S, Ogai A, Asanuma H, Sakata Y, Asakura M, Ogita H, Liao Y, Fukushima T, Yamada J, Minamino T, Kuzuya T, Hori M. Differential subcellular actions of ACE inhibitors and AT(1) receptor antagonists on cardiac remodeling induced by chronic inhibition of NO synthesis in rats. *Hypertension*. 2001; 38(3):404-11.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res*. 1994 Apr;27(4):1033-47.

Santos R, Campagnole-Santos M, Andrade S. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 2000; 91: 45-62.

Santos RA, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 8258–8263.

Santos RA, Ferreira AJ. Angiotensin (1-7) and the renin-angiotensin system.” *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16:122-8.

Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimarães AL, de Paula AM, Campagnole-Santos MJ, Alvarez-Leite JJ, Bader M, Santos RA. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept*. 2012 . (En prensa)

Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of Propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334(1):99-105.

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101:1899-1906.

Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998 Jul; 32(1):59-64.

Schmitt CA, N. Handler, E.H. Heiss, T. Erker, V.M. Dirsch, No evidence for modulation of endothelial nitric oxide synthase by the olive oil polyphenol hydroxytyrosol in human endothelial cells, *Atherosclerosis* 195 (2007) e58–e64.

Schulman IH, Zhou MS, Treuer AV, Chadipiralla K, Hare JM, Raij L. Altered renal expression of angiotensin II receptors, renin receptor, and ACE-2 precede the development of renal fibrosis in aging rats. *Am J Nephrol*. 2010; 32(3):249-61.

Sedová L, Bérubé J, Gaudet D, Dumont M, Tremblay J, Hamet P, Pausová Z. Diet-induced obesity delays cardiovascular recovery from stress in spontaneously hypertensive rats. *Obes Res*. 2004; 12(12):1951-8.

Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, Alba F, Vives F, De Gasparo M, Ortega E, Ruiz E, Prieto I. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. *Horm Metab Res*. 2008; 40(4):289-91.

Segarra AB, Ramírez M, Villarejo AB, Banegas I, Vives F, de Gasparo M, Alba F, Cobo J, Prieto I. Hypothalamic and plasmatic angiotensin metabolism in L-NAME treated rats. *Horm Metab Res*. 2010; 42(3):222-4.

Segarra AB, Ruiz-Sanz JI, Ruiz-Larrea MB, Ramírez-Sánchez M, de Gasparo M, Banegas I, Martínez-Cañamero M, Vives F, Prieto I. The profile of fatty acids in frontal cortex of rats depends on the type of fat used in the diet and correlates with neuropeptidase activities. *Horm Metab Res* 2011;43:86–91.

Segarra AB, Prieto I, Banegas I, Villarejo AB, Wangesteen R, De Gasparo M, Vives F, Ramírez M. Asymmetrical effect of captopril on the angiotensinase activity in frontal cortex and plasma of the spontaneously hypertensive rats: expanding the model of neuroendocrine integration. *Behav Brain Res*. 2012; 230(2):423-7.

Segarra AB, Prieto I, Villarejo AB, Banegas I, Wangesteen R, de Gasparo M, Vives F, Ramírez-Sánchez M. Effects of Antihypertensive Drugs on Angiotensinase Activities in the Testis of Spontaneously Hypertensive Rats. *Horm Metab Res*. 2012 Dec 7. [Epub ahead of print].

Segarra AB, Prieto I, Banegas I, Villarejo AB, Wangenstein R, de Gasparo M, Vives F, Ramírez-Sánchez M. The Brain-Heart Connection: Frontal Cortex and Left Ventricle Angiotensinase Activities in Control and Captopril-Treated Hypertensive Rats—A Bilateral Study, *Int J Hypertens*, vol. 2013, Article ID 156179, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/156179.

Serrano Martínez M. Hipertensión Arterial. La perspectiva del médico de familia. *An. Sist. Sanit. Navar*, 2008. Vol.31, Nº 2.

Shin SJ, Lim JH, Chung S, Youn DY, Chung HW, Kim HW, Lee JH, Chang YS, Park CW. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activator fenofibrate prevents high-fat diet-induced renal lipotoxicity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2009; 32(10):835-45.

Sim MK, Qiu Xs. Formation of des-Asp-angiotensin I in the hypothalamic extract of normo and hypertensive rats. *Blood Press* 1994; 3:260-4.

Simões-e-Silva A, Baracho N, Passaglio K, Santos R. Renal actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 503-513.

Simonet S, Isabelle M, Ragonnet C, Sansilvestri-Morel P, Clavreul N, Vayssettes-Courchay C, Verbeuren TJ. Chronic reduction of nitric oxide level in adult spontaneously hypertensive rats induces aortic stiffness similar to old spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res*. 2012;49(4):309-18. Epub 2012 May 9.

Siragy HM. AT(1) and AT(2) receptors in the kidney: role in disease and treatment. *Am J Kidney Dis*. 2000; 36 (3 Suppl 1):S4-9.

Sokolis DP, Lampropoulos KM, Dimitriou CA, Balafas E, Boudoulas H, Karayannacos PE. Time-course of mechanical changes of the rat aorta following chronic beta-blocker treatment. *Hellenic J Cardiol*. 2010; 51(1):19-26.

Söderberg C, Giugni TD, Zaia JA, Larsson S, Wahlberg JM, and Möller E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol*. 1993; 67(11): 6576–6585.

Skov K, Nyengaard JR, Korsgaard N, Mulvany MJ. Number and size of renal glomeruli in Spontaneously Hypertensive Rats. *J.Hypertens*. 1994; 12, 1373-1376.

Soriguer F, Rojo-Martínez G, Dobarganes MC, García Almeida JM, Esteva I, Beltrán M, Ruiz De Adana MS, Tinahones F, Gómez-Zumaquero JM, García-Fuentes E, González-Romero S. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 1092–7.

Soriguer F, Rojo-Martínez G, de Fonseca FR, García-Escobar E, García Fuentes E, Olveira G. Obesity and the metabolic syndrome in Mediterranean countries: a hypothesis related to olive oil. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51(10):1260-7.

Spector S, Fleish JH, Maling HM, Brodie BB. Vascular smooth muscle reactivity in normotensive and hypertensive rats. *Science* 1996; 166:1300-1301.

Speth R, Karamyan V. The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain. *Heart Fail Rev* 2008; 13: 299-309.

Stragier B, De Bundel D, Sarre S, Smolders I, Vauquelin G, Dupont A, Michotte Y, Vanderheyden P. Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. *Heart Fail Rev*. 2008 Sep;13(3):321-37. Epub 2007 Nov 8.

Stroth U, Unger T. The Renin angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33 (Suppl.1): S21-S28.

Suganuma T, Ino K, Shibata K, Nomura S, Kajiyama H, Kikkawa F, Tsuruoka N, Mizutani S. Regulation of aminopeptidase A expression in cervical carcinoma: role of tumor-stromal interaction and vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2004; 84: 639-648.

Takada T, Nakata K, Yamauchi H, Iso T. Combined effect of (2R, 4R)-2-(o-hydroxyphenyl)-3-(3-mercaptopropionyl)-4-thiazolidinecarboxylic acid (SA446) with hydrochlorothiazide or propranolol on development of hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) by long-term administration. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 1986 Mar; 87(3):331-7. Japanese.

Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J. Clin. Invest*. 1997. 99: 278-287.

Tanase H, Suzuki Y. Strain difference and genetic determination of blood pressure in rats. *Exp. Animals (Japan)* 1971; 20, 1-5.

Tanase H, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W. Heart size in inbred strains of rats. Part 1. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension* 1982; 4,864-872.

Tamargo Menéndez, J. Recuerdo Fisiológico del sistema Renina- Angiotensina - Aldosterona. *Medicine* 1996; 7: (21):829-835.

Taylor A. Aminopeptidases: structure and function. *The FASEB Journal* 1993; 7: 290-298.

Teng KT, Nagapan G, Cheng HM, Nesaretnam K. Palm olein and olive oil cause a higher increase in postprandial lipemia compared with lard but had no effect on plasma glucose, insulin and adipocytokines. *Lipids*. 2011 Apr;46(4):381-8. Epub 2011 Jan 1.

Terés S, Barceló-Coblijn G, Benet M, Álvarez R, Bresani R, Halver JE, Escribá PV. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *PNAS*. 2008; Vol.15, n°37, 13811-13816

Tierney AC, Roche HM. The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity. *Mol Nutr Food Res*. 2007 Oct;51(10):1235-48.

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 205-251

Tobe H, Kojima F, Aoyagi T, Umezawa H. Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochem Biophys Acta*. 1980; 613:459-68

Török J, Holéciová A, Kyselá S, Bernátová I, Pechánová O. Changes in reactivity of pulmonary and systemic arteries in chronic NO-deficient hypertension. *Cardiología* 1998; 7: 30-36.

Török J. Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. *Physiol. Res*. 2008; 57: 813-825.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):639-72.

Tsujii S, Bray GA. A beta-3 adrenergic agonist (BRL-37,344) decreases food intake. *Physiol Behav.* 1998; 63(4):723-8

Tsujimoto M, Hattori A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochim Biophys Acta* 2005; 145:1233-1248.

Tsujimoto M, Goto Y, Maruyama M, Hattori A. Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail Rev* 2008; 13: 285-291.

Vacchiano CA, Tempel GE. Role of nonenzymatically generated prostanoid, 8-iso- PGF 2 α , in pulmonary oxygen toxicity. *J. Appl. Physiol* 1994; 77, 2912-2917.

Varagic J, Trask A, Jessup J, Chappell M, Ferrario C. New angiotensins. *J Mol Med* 2008; 86: 663 – 671.

Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, Teräväinen TL, Laakso J, Karppanen H, Vapaatalo H. Cardiovascular effects of chronic inhibition of nitric oxide synthesis and dietary salt in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 1997;20:183-192.

Vázquez Vigoa A, Cruz Álvarez N, González del Valle Z, Vázquez Cruz A. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Rev. Cubana Med* 1998; 37(2): 83-92.

Velez JC. The importance of the intrarenal renin-angiotensin system. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2009; 5(2):89-100.

Velez JC, Ryan KJ, Harbeson CE, Bland AM, Budisavljevic MN, Arthur JM, Fitzgibbon WR, Raymond JR, Janech MG. Angiotensin I is largely converted to angiotensin (1-7) and angiotensin (2-10) by isolated rat glomeruli. *Hypertension.* 2009;53:790-797.

Villarejo AB, Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, Wangenstein R, de Gasparo M, Cobo J, Alba F, Vives F, Prieto I. Angiotensinase and Vasopressinase Activities in Hypothalamus, Plasma, and Kidney after Inhibition of Angiotensin-converting Enzyme: Basis for a New Working Hypothesis. *Horm Metab Res.* 2012; 44(2):152-4.

Visioli F, Caruso D, Galli C, Viappiani S, Galli G, Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 278(3):797-9.

Visioli F, Andrea Poli, Claudio Galli. Antioxidant and other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive oil. *Med Res Rev*, 2002; Vol. 22, No 1, 65- 75.

Vives F, Segarra AB, Villarejo AB, Banegas I, Wangenstein R, Ramírez M, Hermoso F, Prieto I. Hypothalamic and Plasmatic Angiotensin Metabolism in L-NAME Treated Hypertensive Rats. 8th IBRO CONGRESS, 14-18 July, 2011, Florence, Italy.

Von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol.* 2000 Apr;83(4):2012-21.

Wangenstein R, Domínguez G, Segarra AB, Banegas I, Ramírez M and Prieto I. Metabolic and cardiovascular effects of different high-fat diets in Rats. *Int J Obes* 2010 34, S82–S84.

Waterman E, Brian Lookwood. Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. *Altern Med Rev* 2007; Vol.12, Number 4.

Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG, Searles CD. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res* 2005; 96:1161-1168.

Weisinger RS, Stanley TK, Begg DP, Weisinger HS, Spark KJ, Jois M. Angiotensin converting enzyme inhibition lowers body weight and improves glucose tolerance in C57BL/6J mice maintained on a high fat diet. *Physiol Behav.* 2009 Aug 4;98(1-2):192-7. Epub 2009 May 22.

Weiss L, Lundgren Y. Left ventricular hypertrophy and its reversibility in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1978;12:635-638.

World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, WHO, 2010.

Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994 Spring;18(1):21-53.

Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin a new look at an old system. *Prog Neurobiol.* 2011; 95(1):49-67.

Yamori, Y. The development of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: *Handbook of Hypertension. Vol.4 Experimental and genetic models of Hypertension* (de Jong W, ed). Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984; pp 224-239.

Yamori Y. Implication of hypertensive rat models for primordial nutritional prevention of cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26:568 –72.

Yang RH, Jin H, Wyss JM, Oparil S. Depressor effect of blocking angiotensin subtype I receptors in anterior hypothalamus. *Hypertension* 1992; 19: 475–81.

Young, D., Waitches, G., Birchmeier, C., Fasano, O. & Wigler, M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell.* 1986 Jun 6;45(5):711-9.

Yu W, Akishita M, Xi H, Nagai K, Sudoh N, Hasegawa H, Kozaki K, Toba K. Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. *Clin Chim Acta.* 2006; 364(1-2):328-34.

Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, Laguna JC, Ros E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women: A randomized cross-over trial. *Ann Intern Med* 2000; 132:538–546.

Zhang T, Reid K, Acuff CG, Jin CB, Rockhold RW. Cardiovascular and analgesic effects of a highly palatable diet in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 48 (1): 57-61.

Zhang L, Edwards DG, Berecek KH. Effects of early captopril treatment and its removal on plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity and arginine vasopressin in hypertensive rats (SHR) and normotensive rats (WKY). Clin Exp Hypertens. 1996; 18(2):201-26.

Zhang W, Thorén P. Hyper-responsiveness of adrenal sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats to ganglionic blockade, mental stress and neuronglucopenia. Pflugers Arch. 1998; 437(1):56-60.

Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, Humphrey JD, Kuo L. Up-regulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. Hypertension 2004; 44:935-943.

Zohn, I. E., Symons, M., Chrzanowska-Wodnicka, M., Westwick, J. K. & Der, C. J. Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. Mol Cell Biol. 1998 Mar; 18(3):1225-35.

Zhou X, Frohlich ED. Analogy of cardiac and renal complications in essential hypertension and aged SHR or L-NAME/SHR. Med Chem. 2007 Jan; 3(1):61-5.

WEBGRAFÍA

- <http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2009/January/Oilseedsfull0109.pdf>.
- <http://www.brenda-enzymes.info>
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>
- <http://www.adam.com/healthsolutions.aspx>
- [http:// www.internationaloliveoil.org.2006](http://www.internationaloliveoil.org.2006)

Summary



University of Jaen

THESIS A. B. VILLAREJO VILLAR

SUMMARY

Effects of antihypertensive drugs, blockers of the synthesis of nitric oxide and extra virgin olive oil on aminopeptidase activities of the systemic and tissue renin-angiotensin systems in a genetic model of hypertension

Directors

Isabel Prieto Gómez

Manuel Ramírez Sánchez

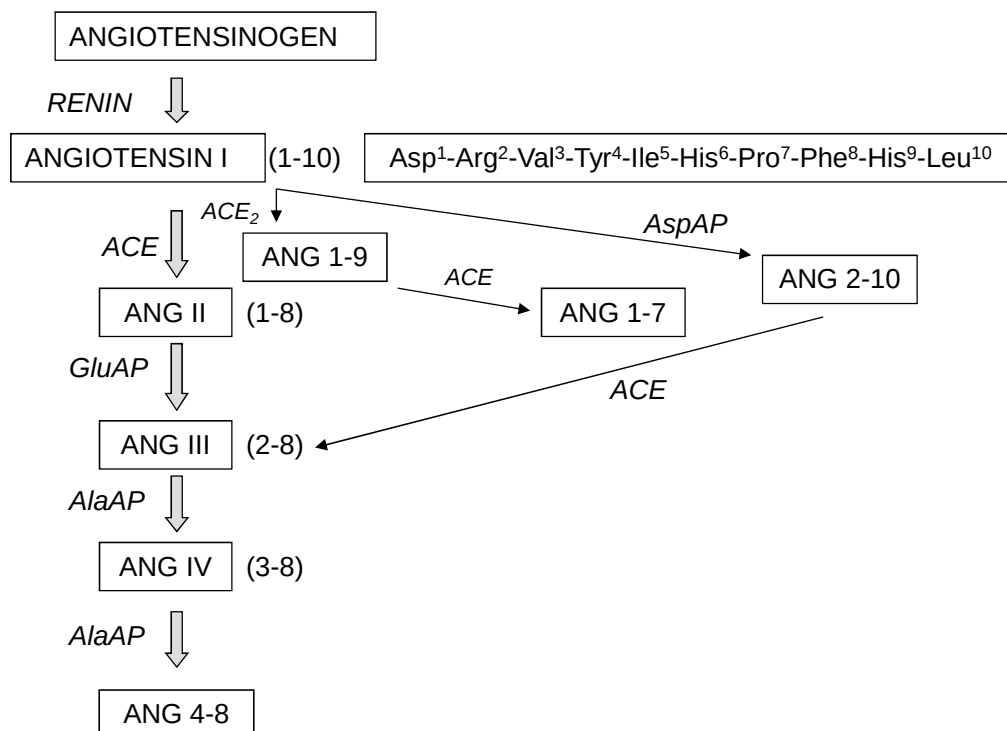
Ana Belén Segarra Robles

1. INTRODUCTION

Hypertension is one of the major cardiovascular risk factors affecting around 10% of population. Treatment effectively reduces cardiovascular morbidity and mortality. Current treatment of hypertension involves diuretics, renin-angiotensin system (RAS) inhibitors or antagonists (angiotensin-receptor blockers, ARB), central or peripheral sympatholytics, calcium channel blockers and vasodilators (*Ferdinand, 2001; Reams & Bauer, 1999*). However, the efficacy of these drugs is still not entirely satisfactory and new approaches should be considered (*Cogolludo et al., 2005*).

Blood pressure (BP) control is the result of a balance of closely-related factors acting at central or peripheral level, some of them having opposite effect. Amongst these factors, the RAS plays an important role. In this system, Ang I is not only converted to Ang II. It is also the initial substrate for various enzymatic conversions leading to multiple peptides with different functions even counteracting each other. The inhibition of a single step of the RAS such as with an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI), may affect the whole system, thus conditioning its effect on BP (*Ferrario, 2011*). Until recently, Ang II was considered the main peptide of the

RAS involved in the control of BP. However, other peptides of the system, such as Ang III, Ang IV, Ang 1-9, Ang 1-7, or Ang 2-10, also seem to play an important role in BP control (*Elased et al., 2008; Speth and Karamyan, 2008*). For example, one of the angiotensin metabolites, Ang 1-7, potentiates the vasodilatory effects of bradykinin, stimulates nitric oxide and prostaglandin release and antagonizes the actions of Ang II (*Schindler et al., 2007*). Moreover, microinjection of Ang 1-7 into brainstem nuclei of the rat promotes hypotension (*Schiavone et al., 1990*). Low dose of Ang II also significantly increase the circulating levels of vasopressin and there exists a relationship between the RAS and the antidiuretic hormone (*Bonjour and Malvin, 1970; Keil et al., 1975*). Also, Ang III and Ang IV affect vasopressin function in the inner medulla altering its antidiuretic effect (*Bankir, 2001; Zini et al., 1996; Albiston et al., 2001*). The formation and inactivation of these angiotensin-related peptides is regulated by various aminopeptidases (AP), called angiotensinases, and by the enzyme vasopressinase. For instance, AspAP is responsible for the metabolism of Ang I to Ang 2-10, GluAP causes the formation of Ang III from Ang II whereas AlaAP is accountable for Ang III metabolism to Ang IV and to Ang 4-8 (Scheme 1) (Table 1). CysAP, also called insulin-regulated aminopeptidase (IRAP), oxytocinase or vasopressinase, was identified to be the AT₄ receptor, binding site of Ang IV (*Ramírez et al., 2008; Ramírez-Sánchez et al., 2013; Vauquelin et al., 2003; Wallis et al., 2007*).



Scheme 1. Partial representation of the RAS in which the peptides and enzymes cited in the text are indicated (see text for abbreviations) (Modified from *Ramírez-Sánchez et al., 2013*).

Regarding the RAS, except if one blocks the cascade at its early step by inhibiting renin with compounds such as Aliskiren (*Zhenfeng et al., 2011*), the alteration of other steps using ACEI or ARB may affect the rest of system. Furthermore, the use of other antihypertensive agents, such as beta-blockers, may also influence the RAS, promoting or inhibiting the formation of specific Ang peptides. These possibilities however have not been systematically considered. Currently, there are increasing evidences that the beneficial effects of these drugs are not only the consequence of their blockade of Ang II or sympathetic actions but also the result of the increased formation of other Ang peptides that counteract the detrimental actions of Ang II (*Ramírez-Sánchez et al., 2013*). In addition, the interaction of RAS with other vasoactive agents, such as nitric oxide (NO) is important in BP control (*de Gasparo, 2002*), being its study necessary for the search of new therapeutic strategies. Finally, the use appropriate diets that include particularly higher percentages of monounsaturated fatty acids is becoming one of the main tendencies for the study of the control of BP (*Ramírez et al., 2008*). Therefore, the use of these vasoactive compounds, including dietary factors, may produce their final effects by the interaction of several parallel pathways, additional to the ones initially mainly analyzed (*Ramírez-Sánchez et al., 2013*) (See global analysis section). For example, it is assumed that the BP lowering effects of ACE inhibitors are due to the peripheral blockade of the Ang II formation. However, ACE is also involved in several steps of the RAS cascade other than Ang II formation from Ang I. It catalyzes the formation of Ang 1-7 from Ang 1-9 (produced by the action of ACE₂ from Ang I) and Ang III from Ang 2-10 (scheme 1). Moreover, ACE activates the degradation of the renal bradykinin. On the other hand, in addition to the circulating RAS, there are local tissue RAS such as in brain and kidney. ACE inhibitors can therefore also act locally in these tissues (*Paul et al., 2006*). Furthermore, brain RAS is also linked to vasopressin action (*Xu and Johnson, 1998; Robinson et al., 1999*). ACE inhibition may therefore modify the whole cascade in plasma as well as in tissues and so can contribute additionally to the effect of ACE inhibitors on BP (*Villarejo et al., 2012*).

In addition, among the factors that interact with the RAS for the BP control, norepinephrine plays a major role (*Zucker and Liu, 2000*) and, as previously was indicated, the use of other antihypertensive agents such as sympathetic beta receptor blockers, may also affect the RAS, activating or inhibiting the formation of specific Ang metabolites of the RAS. However, this possibility has been scarcely investigated (*Vilas-Boas et al., 2008*).

On the other hand, it is well known that the RAS interacts with nitric oxide (NO) in the control of blood pressure at central and peripheral level (*de Gasparo, 2002; Raij, 2001*). Currently it is accepted that NO counteracts the hypertensive actions of RAS mainly keeping a balance with Ang II in physiological conditions. An Ang II-NO imbalance in favor of Ang II may therefore in part cause an increase in BP. This increase might be also due to the modification of other components of the RAS at central and/or peripheral level and preliminary results have been already published (*Segarra et al, 2010*). However, this possibility has not yet been sufficiently investigated.

Main name	E.C. number	Other names	Artificial substrate	Natural substrate
Glutamyl-Aminopeptidase (GluAP)	3.4.11.7	AP A	Glu- β -NNap	Ang II
Aspartyl-Aminopeptidase (AspAP)	3.4.11.21		Asp- β -NNap	Ang I
Alanyl-Aminopeptidase (AlaAP)	3.4.11.2	AP M, AP N	Ala- β -NNap	Ang III, Ang IV
Cystinyl-Aminopeptidase (CysAP)	3.4.11.3	Oxytocinase Vasopressinase IRAP	Cys- β -NNap	Oxytocin Vasopressin

Table 1. Summary of characteristics of the aminopeptidases studied in the present research. β -Naphthylamide (β -NNap). (See text for abbreviations) (*Barret et al., 1998; Vauquelin et al., 2003; Wallis et al., 2007*).

Finally, a diet rich in fruits, vegetables and low-fat dairy products, and reduced in saturated fat, total fat and cholesterol (the 'DASH' diet) significantly lowers blood pressure (BP). This effect has been suggested to be due in part to a counter-regulatory response of the renin-angiotensin system (*Chen et al., 2012*). The reduction of saturated fat in favor of mono and/or polyunsaturated fat attenuated the development of hypertension. This effect being mediated, at least in part, by interference with the renin-angiotensin-aldosterone system, at the level of blockade of ANG II receptors (*Engler et al., 1998*). Again, it is propose that this effect may be due in part to the influence of other components of RAS than Ang II (*Segarra et al., 2008*).

Therefore, to analyze the differences in the patterns of response to the administration of some vasoactive compounds, we

studied several physiologic and metabolic parameters, as well as some aminopeptidase activities in plasma, hypothalamus and kidney of hypertensive rats after the administration of captopril, propranolol and L-NAME and after fed a diet enriched with extra virgin olive oil.

2. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Hypertension is one of the major cardiovascular risk factors. Treatment effectively reduces cardiovascular morbidity and mortality by reducing in part the deleterious effects of Ang II. However, the efficacy of the current treatment of hypertension is still not entirely satisfactory and new approaches should be considered.

The RAS plays a major role in the control of blood pressure, not only through factors that increased it, such as Ang II, but also through the action of other Ang peptides that counterbalance Ang II, their functional status being controlled by several proteolytic enzymes called angiotensinases.

Considering the RAS, the use of several vasoactive compounds such as the drugs captopril and propranolol, the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME as well as dietary extra virgin olive oil, may produce their physiologic consequences by parallel pathways other than the ones initially established and also generate other pleiotropic actions than the ones considered as major.

Therefore, in order to obtain new suggestions on other relevant pathways involved in the mechanisms of action of several vasoactive compounds and their consequences of administration on the RAS and on other physiologic or metabolic parameters, we studied fluorimetrically, using arylamide derivatives as substrates, the behavior of several angiotensinase and vasopressinase activities in plasma, hypothalamus and kidney of hypertensive adult male rats (spontaneously hypertensive rats) after inhibition of ACE with captopril, after the peripheral sympathetic blockade with the beta-blocker propranolol, after the inhibition of the NO synthesis with L-NAME, all of them administered in drinking water, and after fed a diet highly enriched with extra virgin olive oil.

3. MATERIALS AND METHODS

Forty eight male spontaneously hypertensive rats (SHR) aged four to five weeks, weighing 100-150 g at the beginning of the study were used for control and treated animals. All experimental procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive 86/609/EEC and reviewed and approved by the bioethics committee of the University of Jaén.

The experimental protocol includes the following groups of SHR:

A) Control (n=8) and captopril (n=8) treated animals. Captopril (100 mg/kg/ day p.o.) was administered daily in drinking water chronically for 4 weeks (*Kline and Mercer, 1987*).

B) Control (n=8) and propranolol (n=8) treated animals. Propranolol (100 mg/kg/day p.o.) was administered daily in drinking water chronically for 4 weeks (*Priviero et al, 2007*).

C) Control (n=8) and L-NAME (n=8) treated animals. L-NAME (70 mg/kg/day p.o.) was administered daily in drinking water chronically for 4 weeks (*Priviero et al, 2007*).

D) Control (fed a standard diet) (n=8) and animals fed a diet enriched with extra virgin olive oil (n=8) for 12 weeks (see composition of diets in tables 2 and 3). The percentage of the main fatty acids of unsaponifiable fraction is indicated in table 4.

COMPOSITION OF DIET	PERCENTAGE
Protein	16,1%
Fat	3,1%
Carbohydrates	80,8%
Minerals	5,1%
Fiber	3,9%

Table 2. Composition of the standard diet.

COMPOSITION OF DIET	PERCENTAGE
Protein	12,9%
Fat	23,1%
Carbohydrates	64,6%
Minerals	4,1%
Fiber	3,1%

Table 3. Composition of the experimental diet.

FATTY ACID	PERCENTAGE
Oleic Acid (C18:1)	75,5 %
Palmitic Acid (C16:0)	11,5 %
Linoleic Acid (C18:2)	7,5 %

Table 4. Composition of the unsaponifiable fraction of olive oil.

Systolic blood pressure was monitored by the plethysmographic method as previously described (*Banegas et al., 2009*). Briefly, SBP was measured by tail-cuff plethysmography in un-anesthetized animals. The rats were placed in plastic holders and warmed to 37° C for each recording session. At least seven determinations were made in every session, and the mean of the stable values within a range of 5 mmHg was recorded as the SBP level. Measurements at the beginning and end were discarded.

For A, B and C, SBP was measured at the beginning of the experimental period, at 15 days and at the end of the experimental period (30 days). Body weight was also measured with the same intervals. In addition, twenty-four hours before sacrifice, animals were housed in metabolic cages and food intake, water intake and urine volume, were measured individually.

For D, SBP was measured at the beginning of the experimental period and every week until the end of the experimental period (12 weeks). Body weight, food and water intake and urine volume, were also measured with the same intervals.

At the end of the treatment period, after recording SBP, body weight, food and water intake and urine volume, blood samples were obtained from the left cardiac ventricle under equithensin anaesthesia (2 ml/kg body weight) and plasma was isolated by centrifugation for 10 min. at 2000 g and stored at -20°C, then each rat was perfused with saline through the left cardiac ventricle. Total heart, from which the left ventricle was dissected, and left kidney were obtained and the weight of all of them was measured. Finally, samples from the hypothalamus, renal cortex and inner medulla were quickly removed and frozen in dry ice. They were dissected as previously described (*Prieto et al., 2003; Segarra et al., 2006*). Briefly, the hypothalamus (pooled left and right) was dissected according to the stereotaxic Paxinos and Watson atlas (1998). The selected area was between 7.7 mm and 3.7 mm anterior to the interaural line. Angiotensin components such as some peptides and enzymes have been reported to be differentially located in kidney (*Grima et al., 1997; Segarra et al., 2006*), for example, angiotensinogen and renin are mainly located in renal cortex and ACE is higher in renal medulla (*Grima et al.,*

1997). Therefore, meticulous care was taken to cut fine strips of the outer cortex and to restrict the medulla to its internal section to limit the presence of juxtamedullar glomerules (*Grima et al., 1997*).

In plasma, the levels of nitric oxide, glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL, LDL, 8-isoprostane, creatinine and aminopeptidase activities were determined as previously reported (*Prieto et al, 2002; Segarra et al, 2008; Banegas et al, 2009; Ramírez et al, 2011* and by standard routine laboratory test).

To obtain the soluble fraction, tissue samples (hypothalamus, renal cortex and inner medulla) were homogenized in 10 volumes of 10 mM HCl-Tris buffer (pH=7.4) and ultracentrifugated at 100 000×g for 30 min (4 °C). The resulting supernatants were used to measure soluble enzymatic activity and protein content, assayed in triplicate. To solubilize membrane proteins, the pellets were rehomogenized in HCl-Tris buffer (pH=7.4) plus 1% Triton X-100. After centrifugation (100 000×g, 30 min, 4 °C), the supernatants were used to measure membrane-bound activity and proteins in triplicate. To ensure the complete recovery of activity, the detergent was removed from the medium by adding to the samples adsorbent polymeric Biobeads SM-2 (100 mg/ml) (Bio-Rad, Richmond, VA, USA) and shaking for 2 h at 4 °C (*Ramírez et al, 2011*).

Aminopeptidase (AP) activities (angiotensinases and vasopressinase) were measured fluorometrically using arylamide derivatives as substrates as formerly described (*Prieto et al., 2002; Ramírez et al 2011*). Briefly, AlaAP and CysAP were measured fluorometrically using as substrates the aminoacyl- β -naphthylamides (aaNNap): AlaNNap and CysNNap, Twenty microliters of each supernatant and plasma was incubated during 30 min at 37 °C with 100 μ l of the substrate solution: 2.14 mg/100 ml AlaNNap or 5.63 mg/100 ml CysNNap, 10 mg/100 ml bovine serum albumin (BSA), and 10 mg/100 ml dithiothreitol (DTT) in 50 mM of phosphate buffer, pH 7.4, for AlaAP and 50 mM HCl-Tris buffer, pH 6, for CysAP. GluAP was determined in a fluorometric assay using GluNNap as the substrate, 20 μ l of each supernatant and plasma was incubated during 30 min at 37 °C with 100 μ l of the substrate solution (22.72 mg/100 ml GluNNap, 10 mg/100 ml BSA, 10 mg/100 ml DTT and 0.555 g/100 ml CaCl_2 in 50 mmol/l HCl-Tris, pH 7.4). AspAP was determined fluorometrically with AspNNap as the substrate, 20 μ l of each supernatant and plasma was incubated for 30 min at 37 °C with 100 μ l of the substrate solution (2.58 mg/100 ml AspNNap, 10 mg/100 ml BSA and 39.4 mg/100 ml MnCl_2 in 50 mmol/l HCl-Tris buffer, pH 7.4).

The sensitivity of the method allows measurements of aminopeptidases in the picomolar range (*Ramírez et al., 2011*). For

the statistical analysis, we used one-way analysis of variance to evaluate differences between groups. Post-hoc comparisons were made with Tukey's test. P-values below 0.05 were considered significant.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. INFLUENCE OF VASOACTIVE COMPOUNDS ON PHYSIOLOGIC AND METABOLIC PARAMETERS

4.1.1. INFLUENCE OF THE ANTIHYPERTENSIVE DRUGS CAPTOPRIL AND PROPRANOLOL

Results are represented in figures 1 to 11.

As previously was indicated, Captopril (100 mg/kg/ day p.o.) and Propranolol (100 mg/kg/day p.o.) were administered daily in drinking water chronically for 4 weeks.

Systolic blood pressure levels under captopril or propranolol treatment are represented in Fig 1. Comparing with controls, SHR treated with captopril demonstrated lower levels of SBP (by 20%). A similar reduction was observed in WKY rats after captopril treatment (Villarejo *et al*, 2011). However, propranolol treatment did not show differences with control SHR in SBP (Segarra *et al*, 2012). Similar results were observed in normotensive rats that did not demonstrate differences after propranolol treatment in SBP compared with control animals (Ramírez *et al*, 2009). Therefore, propranolol at the dose used in this study did not affect at all SBP and similar negative results were previously reported (deBlois *et al*, 1997).

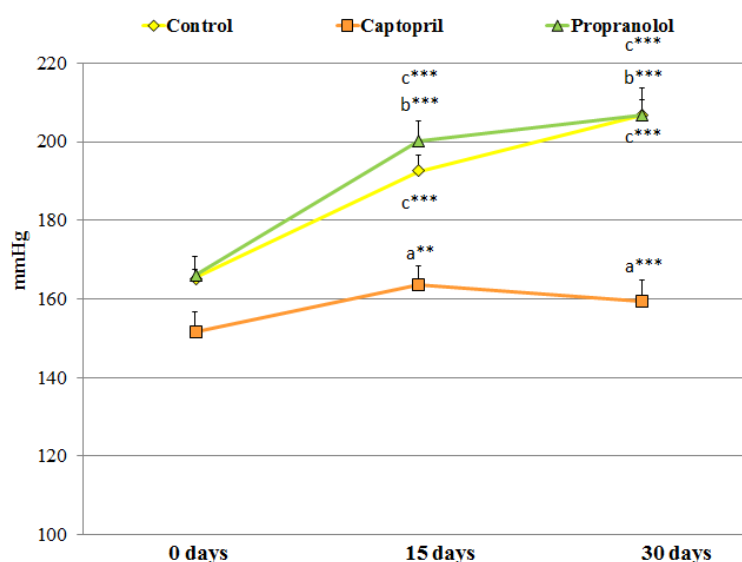


Figure 1: Mean values $\pm$ standard error of systolic blood pressure (mmHg) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups, throughout the experimental period. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups, c: differences respect 0 day in each group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

At the end of the period of treatment (30 days), the animals treated with captopril did not differ from controls in their body weights. However, BW was significantly lower ($p<0.001$) in propranolol treated rats than controls (Fig 2). At 30 days of treatment, controls and captopril-treated SHR increased their BW similarly by 50 g comparing with the beginning of treatment (0 day). However, propranolol-treated SHR reduced their BW by 5 g (Fig 3). A significant decrease ($p<0.05$) in food intake could be observed in propranolol-treated SHR (Fig 4) which, may explain the reduction in BW determined in the same group.

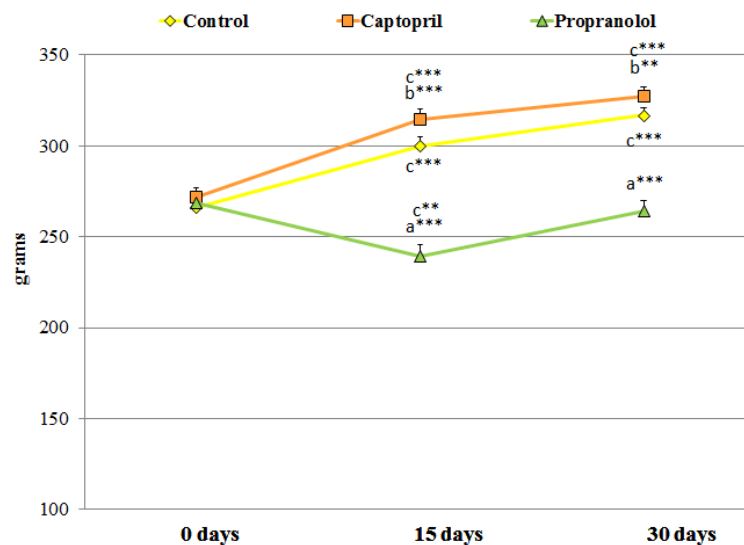


Figure 2: Mean values $\pm$ standard error of body weight (g) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups, throughout the experimental period. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups, c: differences respect 0 day in each group. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

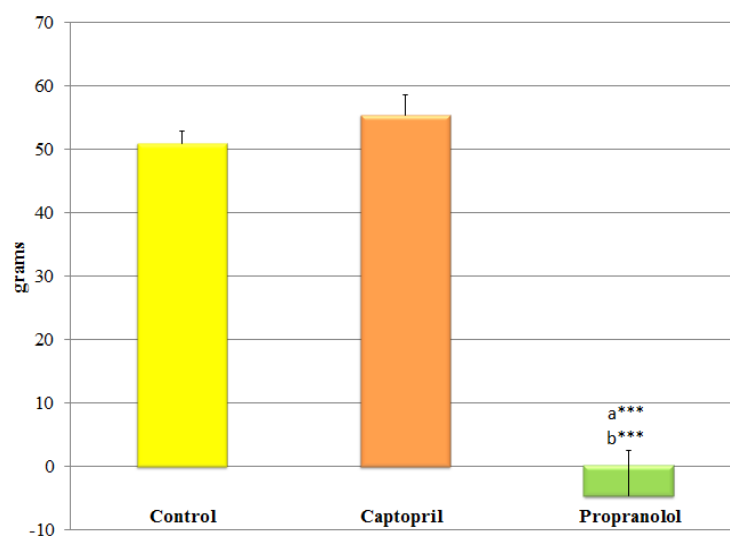


Figure 3: Mean values $\pm$ standard error of total body weight increase (g) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups at the end of the experimental period. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. *** $p<0.001$.

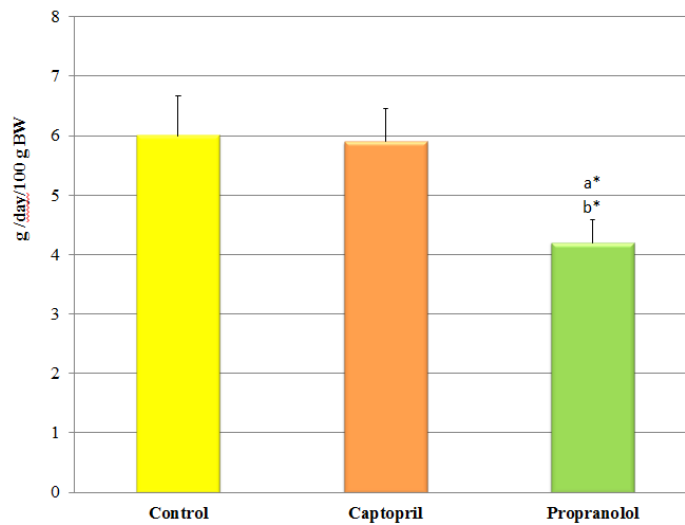


Figure 4: Mean values $\pm$ standard error of food intake (g/day/100g BW) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. * $p < 0.05$.

The weight of heart, left ventricle and left kidney were also measured (Fig 5). Captopril treatment reduced significantly the weight of total heart and left ventricle (*Segarra et al, 2013*), but not left kidney. Propranolol treatment, with the dosage used in the present investigation, failed to reduce the previously described increase in weight of heart, left ventricle and left kidney of SHR (*Weiss and Lundgren, 1978*).

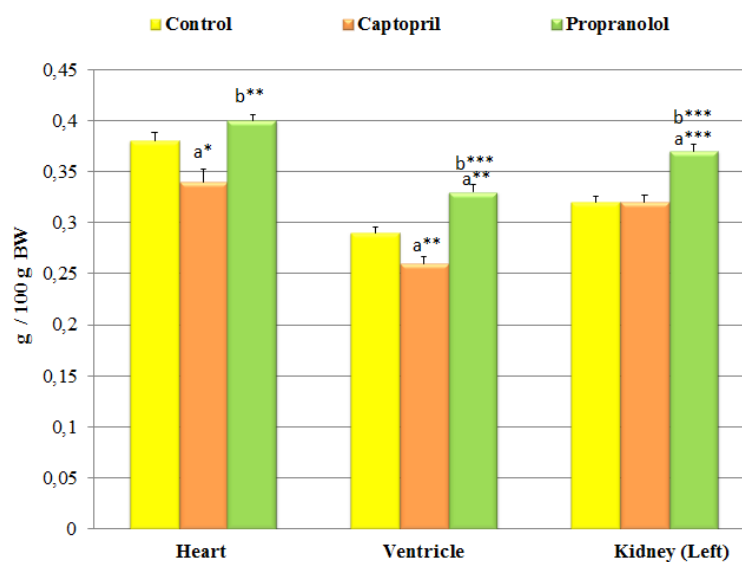


Figure 5: Mean values $\pm$ standard error of heart, ventricle and left kidney weights (g/100g BW) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Water intake (Fig 6) did not change with captopril treatment but decreased significantly ($p < 0.01$) after propranolol treatment in SHR. Diuresis increased significantly ($p < 0.05$) in captopril group but

did not change after propranolol treatment (Fig 7). In normotensive animals (*Villarejo et al, 2012*) the results differed markedly from the present ones in SHR for the captopril group: Water intake and urine volume showed a highly significant increase ($p<0.001$) after captopril treatment.

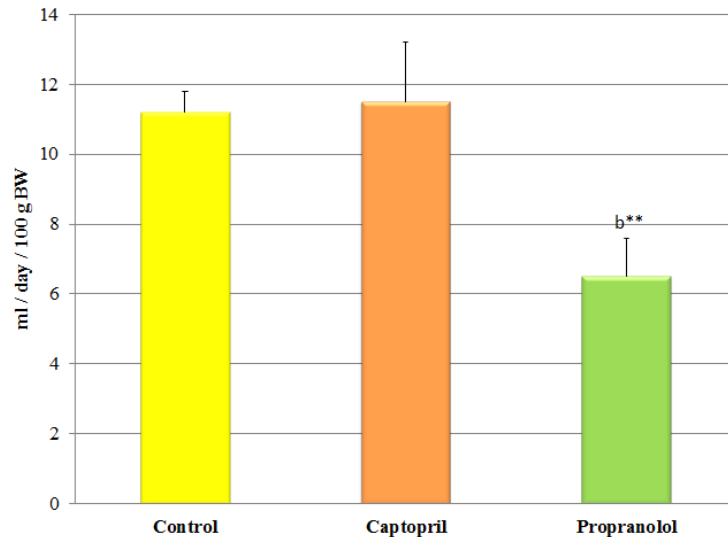


Figure 6: Mean values $\pm$ standard error of water intake (g/day/100g BW) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. b: differences between CA and P groups. ** $p<0.01$.

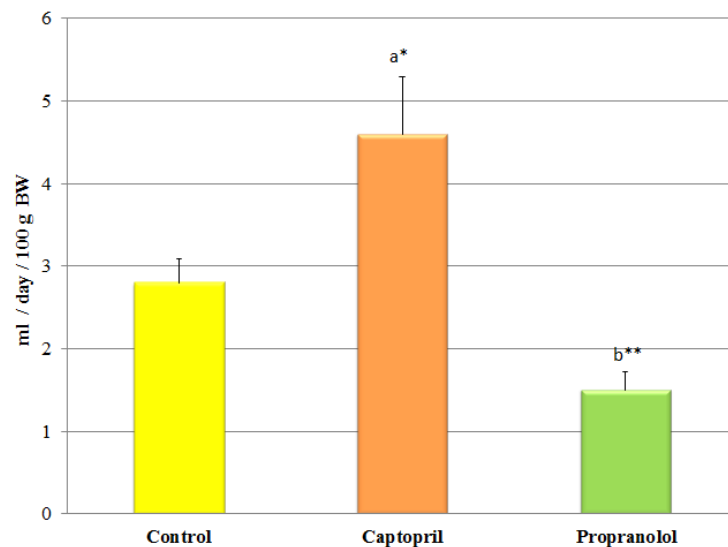


Figure 7: Mean values $\pm$ standard error of diuresis (g/day/100g BW) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

The levels of nitric oxide and glucose (Figs 8 and 9) in plasma did not differ between groups. Compared with control SHR, the analysis of lipids (total cholesterol, triglycerides, HDL, LDL) (Fig 10) only demonstrated a significant increase ($p<0.05$) of triglycerides after propranolol treatment which is in agreement with the literature (*Darga et al, 1991*). However, the rest did not demonstrate differences between groups.

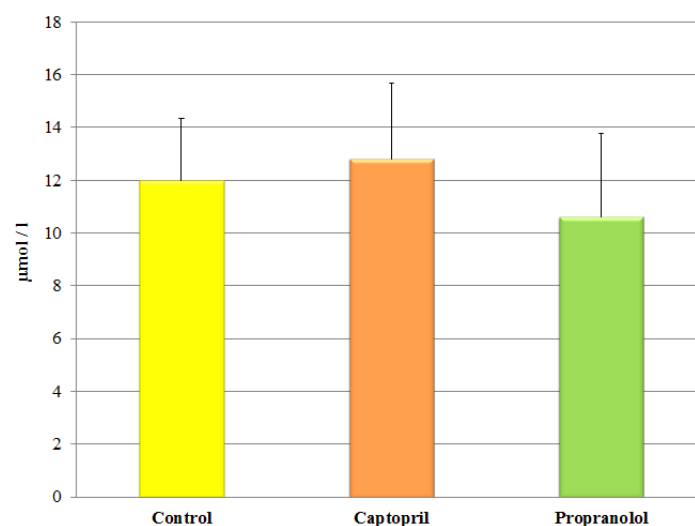


Figure 8: Mean values $\pm$ standard error of plasma nitric oxide ($\mu\text{mol/l}$) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups.

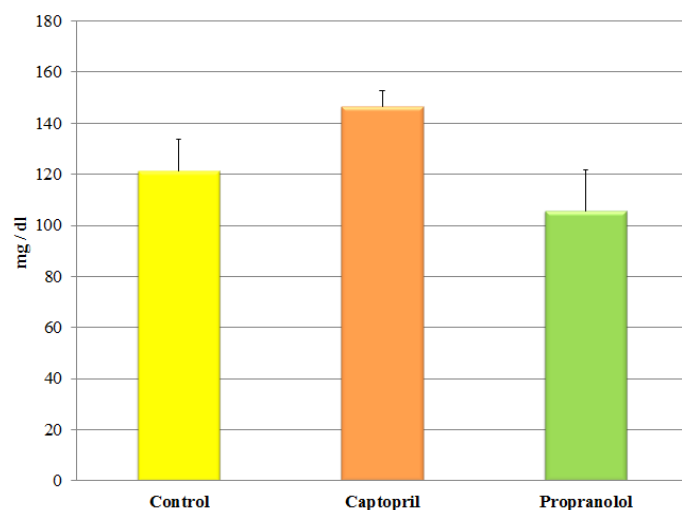


Figure 9: Mean values $\pm$ standard error of plasma glucose (mg/dl) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups.

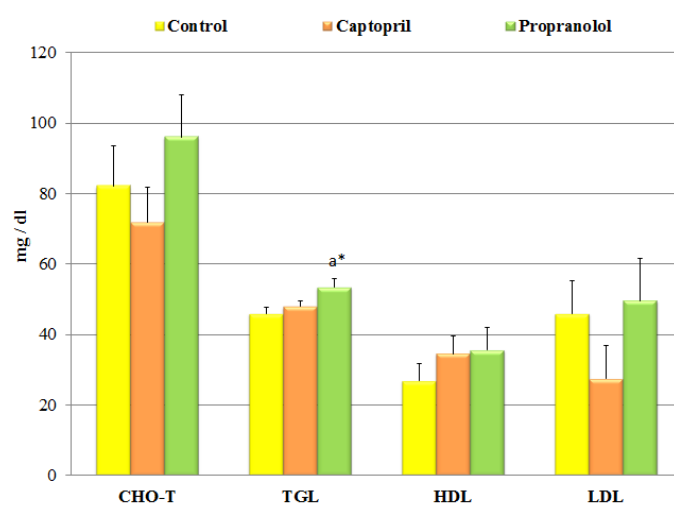


Figure 10: Mean values $\pm$ standard error of plasma triglycerides (TGL), total cholesterol (CHO-T), HDL and LDL cholesterol (mg/dl) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$.

As reflect of oxidative stress, the quantity of 8-isoprostane was measured in urine of the different groups analyzed. The results are represented in Fig 11. Comparing with control SHR, captopril treatment did not modify the levels of 8-isoprostanes in urine, which, differs with other reports that describe a reduction of 8-isoprostanes under the effect of ACE inhibitors (*Yu et al, 2006*). However, propranolol reduced significantly ($p<0.01$) the levels of 8-isoprostanes which, is indicative of a decrease of the oxidative stress as also was suggested recently (*Kramer et al, 2012*).

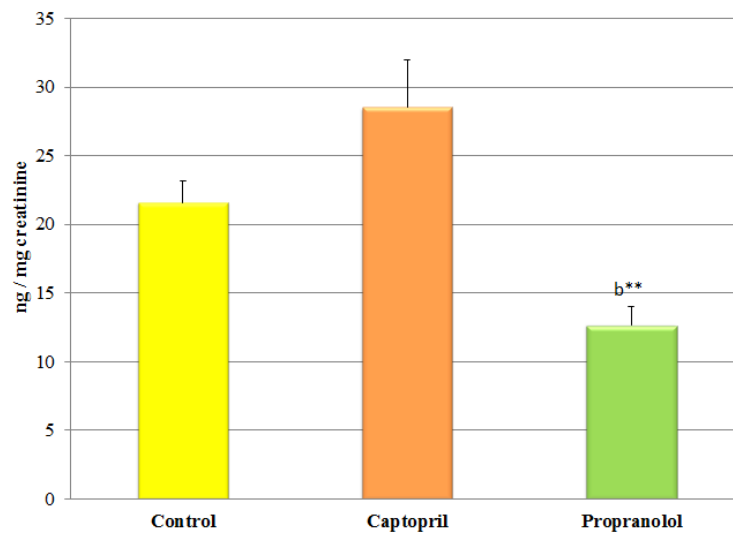


Figure 11: Mean values $\pm$ standard error of urine 8-isoprostanes (ng/mg creatinine) in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. b: differences between CA and P groups. ** $p<0.01$.

4.1.2. INFLUENCE OF THE INHIBITION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION BY L-NAME

Results are represented in figures 12 to 22.

As previously was indicated, L-NAME (70 mg/kg/day p.o.) was administered daily in drinking water chronically for 4 weeks.

At the end of the treatment period, measurements of SBP (Fig 12) demonstrated significantly higher levels ($p < 0.05$) in L-NAME treated SHR than in controls (14% higher) (Vives et al, 2011), smaller increase than the previously observed in normotensive animals (42% from controls) (Segarra et al., 2010).

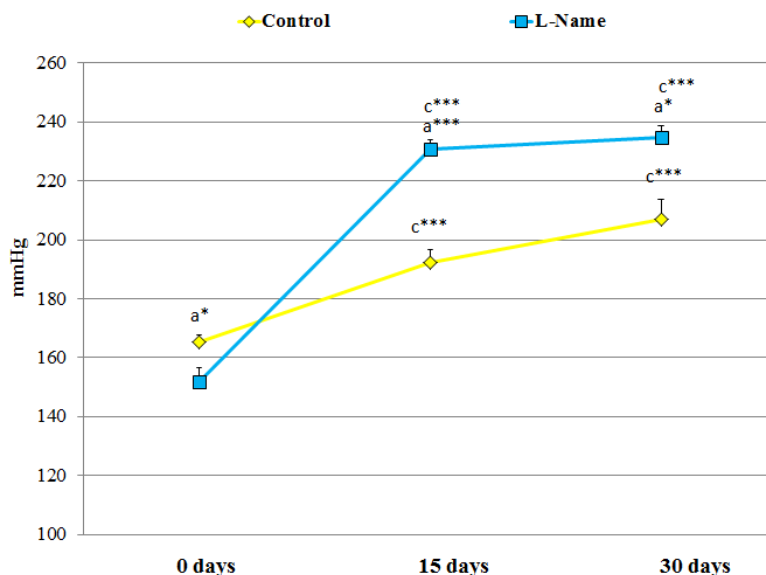


Figure 12: Mean values $\pm$ standard error of systolic blood pressure (mmHg) in Control (C) and L-Name groups throughout the experimental period. a: differences respect to C group, c: differences respect 0 day in each group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

No differences in body weight between control and L-NAME groups were observed at the end of the treatment period (Figs 13 and 14). This is in agreement with the absence of differences in food intake between control and L-NAME groups (Fig 15)

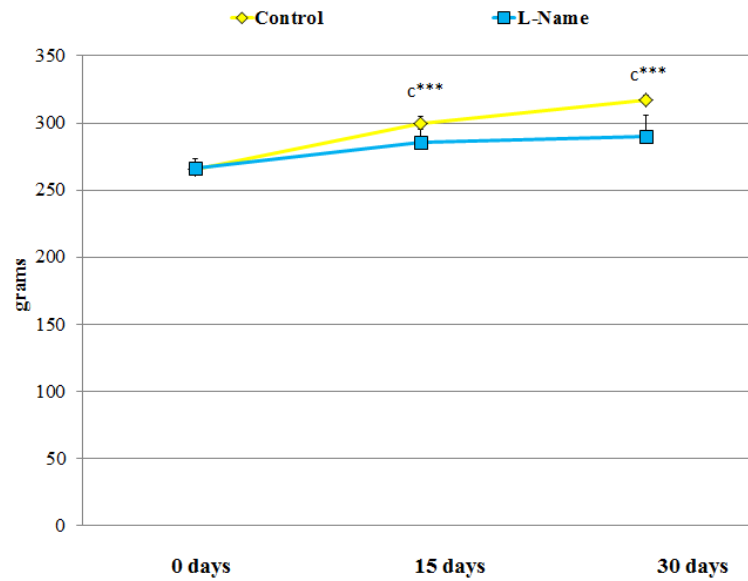


Figure 13: Mean values $\pm$ standard error of body weight (g) in Control (C), and L-Name groups, throughout the experimental period. c: differences respect 0 day in each group. *** $p < 0.001$.

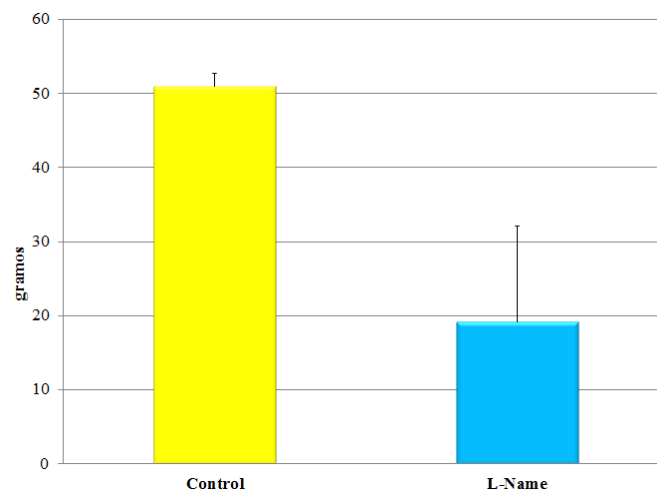


Figure 14: Mean values $\pm$ standard error of total body weight increase (g) in Control (C) and L-Name groups at the end of the experimental period.

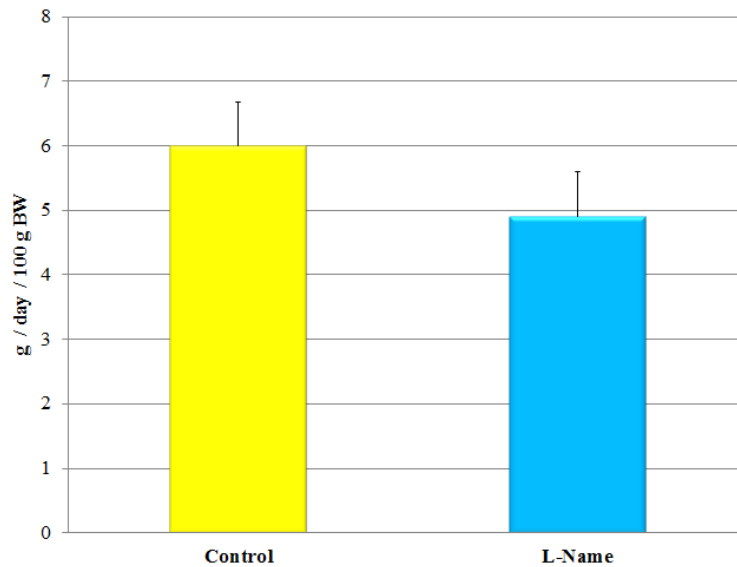


Figure 15: Mean values $\pm$ standard error of food intake (g/day/100g BW) in Control (C) and L-Name groups.

Measurements of weight of heart and kidney (Fig 16) demonstrated a significant increase in total heart ($p < 0.01$), left ventricle ($p < 0.01$) and left kidney ($p < 0.05$) after L-NAME treatment. This is in agreement with previous reports which, described that L-NAME treatment induced an increase in left ventricular mass in genetically hypertensive rats but not in normotensive ones (*Orange et al, 2000*) and also induced renal hypertrophy (*Vaskonen et al, 1997*).

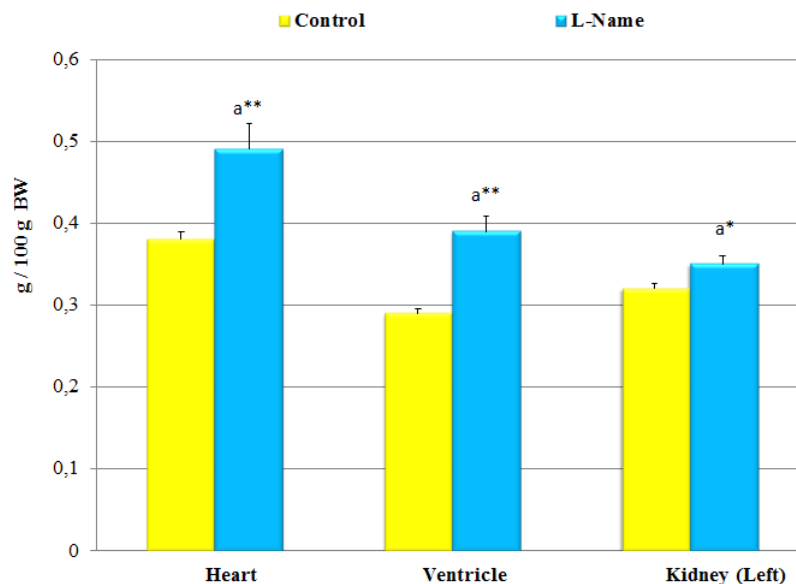


Figure 16: Mean values $\pm$ standard error of heart, ventricle and left kidney weights (g/100g BW) in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Water intake did not differ between control and L-NAME groups (Fig 17). This result, contrast with the significant increase ($p < 0.05$) in

urine volume observed in L-NAME group (Fig 18) and support that the increase in SBP could be mainly due to increased vascular resistance or cardiac output.

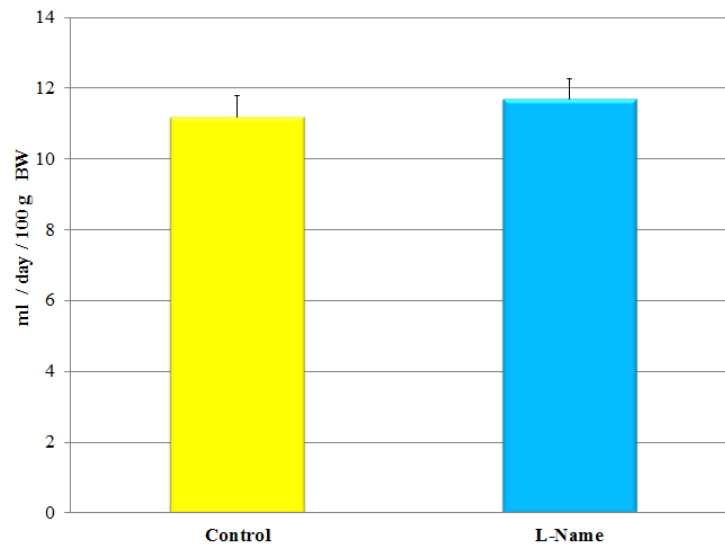


Figure 17: Mean values $\pm$ standard error of water intake (ml /day/100g BW) in Control (C) and L-Name groups.

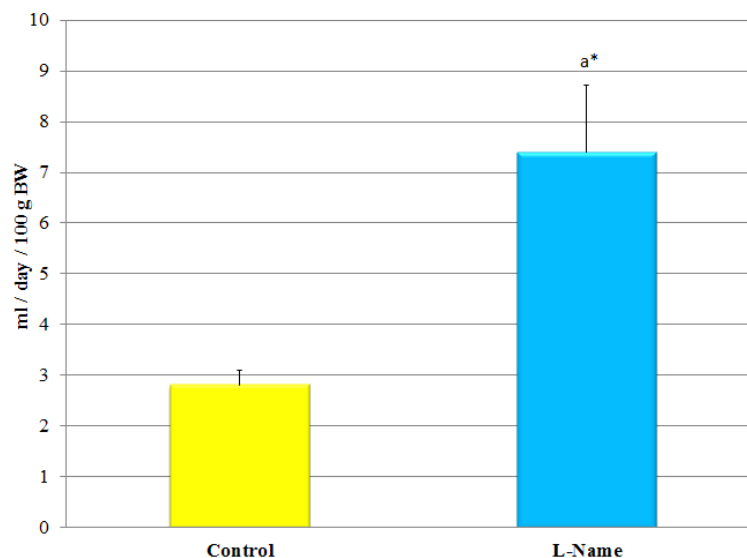


Figure 18: Mean values $\pm$ standard error of diuresis (ml / day / 100g BW) in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$.

At the dosage of L-NAME used, the levels of nitric oxide in plasma were significantly lower ($p < 0.05$) (50% lower) than control SHR (Fig 19). In parallel, the levels of 8-isoprostanes in urine were significantly higher ($p < 0.05$) (50% higher) than control SHR (Fig 20).

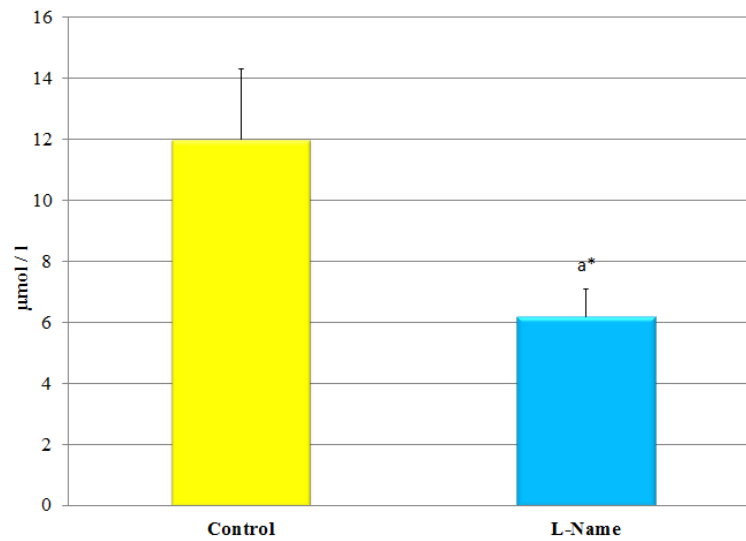


Figure 19: Mean values $\pm$ standard error of plasma nitric oxide ($\mu\text{mol/l}$) in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$.

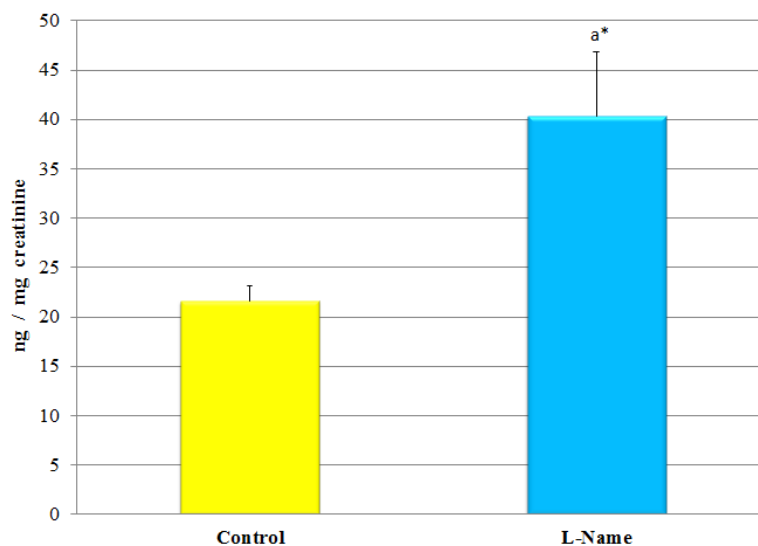


Figure 20: Mean values $\pm$ standard error of urine 8-isoprostanes (ng/mg creatinine) in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$.

With regard to the levels of glucose and lipids in plasma (Figs 21 and 22), as occurred with propranolol treatment, only the levels of triglycerides differ from control group under L-NAME treatment, being significantly higher ($p < 0.01$) in L-NAME group. The increase in triglycerides, contrast with previous reports describing no changes in triglycerides after L-NAME treatment (*Navarro et al, 1994*).

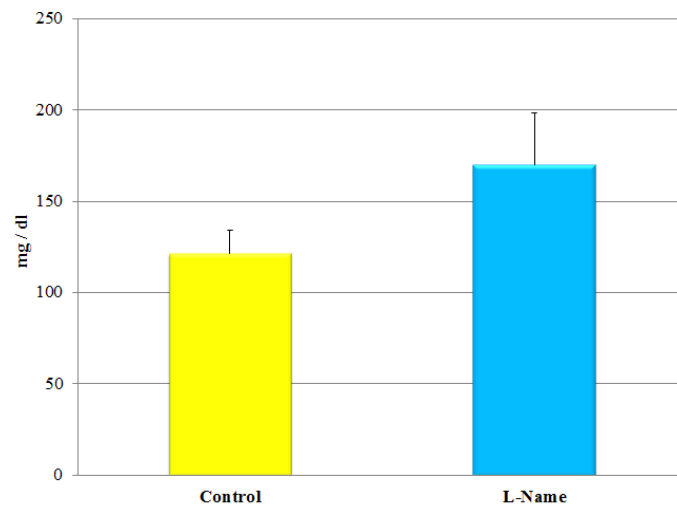


Figure 21: Mean values $\pm$ standard error of plasma glucose (mg/dl) in Control (C) and L-Name groups.

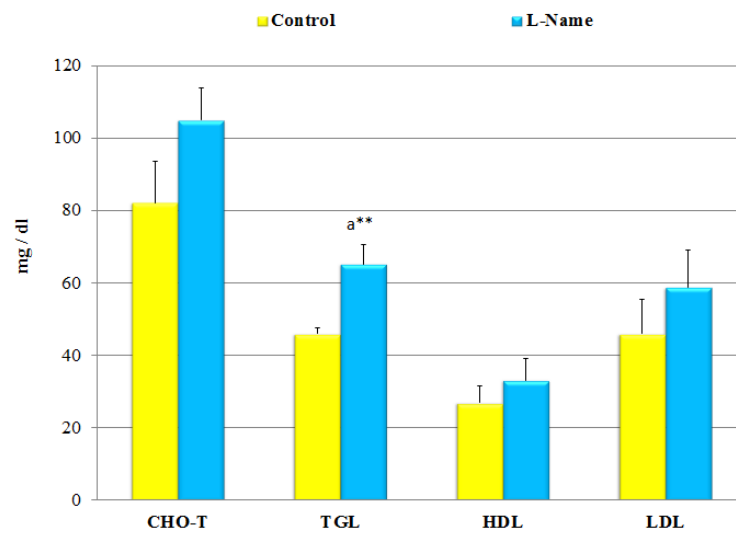


Figure 22: Mean values $\pm$ standard error of plasma triglycerides (TGL), total cholesterol (CHO-T), HDL and LDL cholesterol (mg/dl) in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. ** $p < 0.01$.

4.1.3. INFLUENCE OF A DIET ENRICHED IN EXTRA VIRGIN OLIVE OIL

Results are represented in figures 23 to 40.

As previously was indicated, animals were fed a standard diet or a diet enriched with extra virgin olive oil for 12 weeks.

Systolic blood pressure levels, monitored through the total experimental period, from week 0 until week 12, in SHR fed a standard (S) diet, considered as controls, and SHR fed a diet enriched with extra virgin olive oil (EVOO), are represented in Fig 23. A progressive significant increase ($p < 0.001$) from the beginning of the experiment was observed in S group. However, the levels of SBP in VOO did not show differences from the beginning of the feeding period (week 0) until week 6 in which increased progressively until the end of the feeding period. In addition, except at the beginning of the experiment in which the S group demonstrated lower SBP levels ($p < 0.01$) than VOO, in the rest of experimental period the levels of SBP were always higher in S than VOO being by 20% higher during the most part of the experiment. These results demonstrated clearly an influence of dietary fatty acids on the regulation of blood pressure as previously was also reported (*Segarra et al, 2008*).

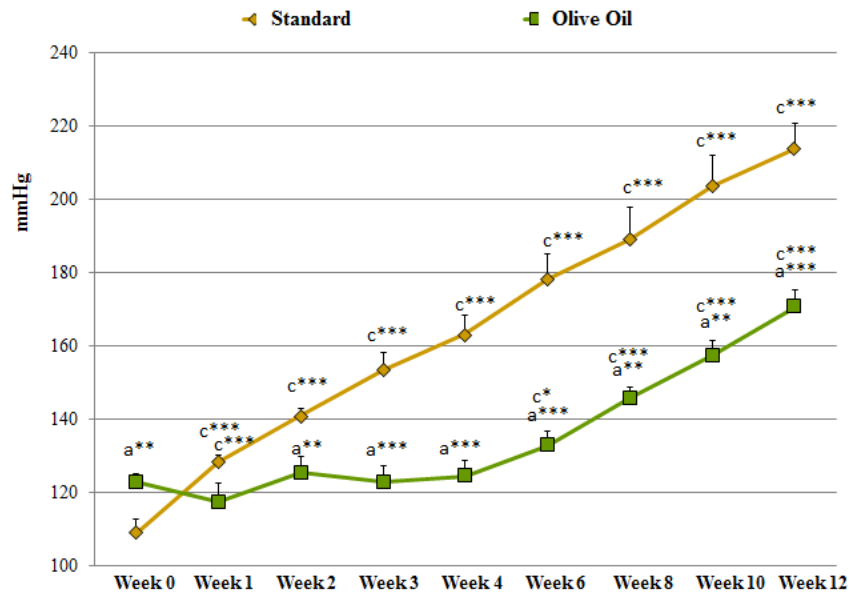


Figure 23: Mean values $\pm$ standard error of systolic blood pressure (mmHg) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups, throughout the experimental period. a: differences respect to S group, c: differences respect 0 week in each group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Body weight increased progressively, without differences between groups, until the end of the experimental period (Fig 24). Therefore, body weight increase was similar in both groups (Fig 25).

In addition, there was no clear pattern for food intake through the feeding period (Fig 26). Therefore, the mean values of food intake were similar for both groups (Fig 27).

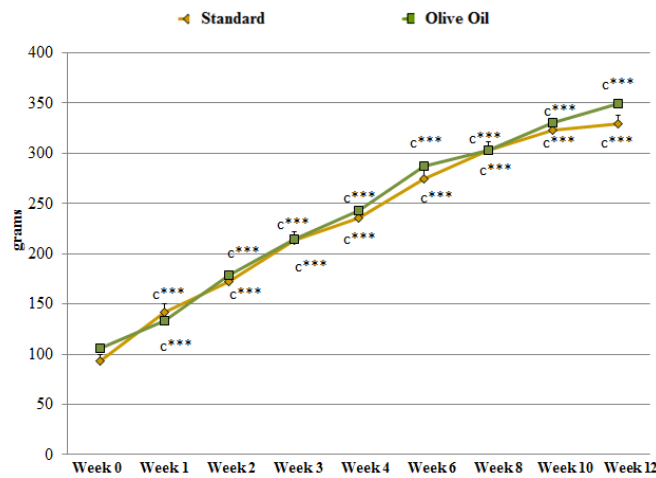


Figure 24: Mean values $\pm$ standard error of body weight (g) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups, throughout the experimental period. c: differences respect 0 week in each group. *** $p < 0.001$.

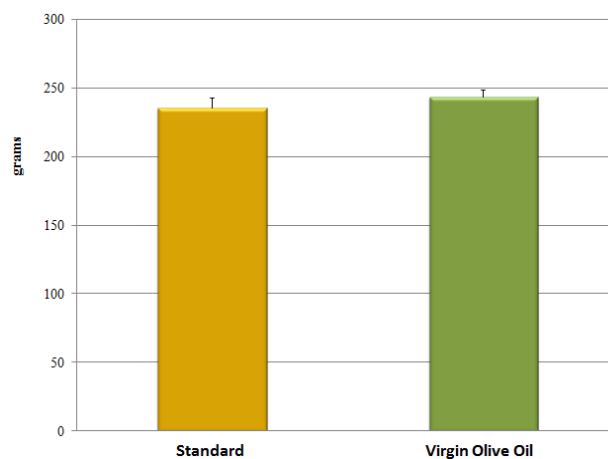


Figure 25: Mean values $\pm$ standard error of total body weight increase (g) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups at the end of the experimental period.

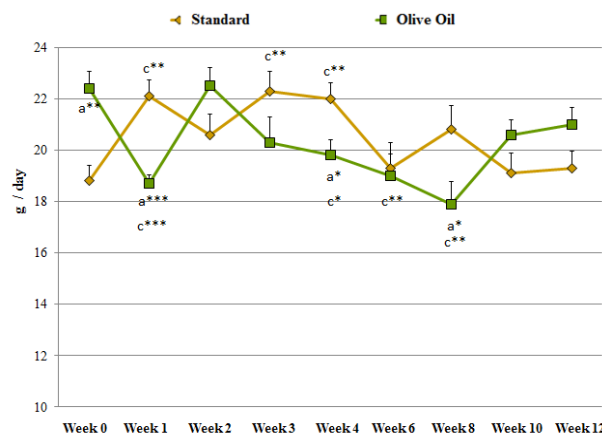


Figure 26: Mean values $\pm$ standard error of food intake (g/day) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups, throughout the experimental period. a: differences between S and VOO groups, c: differences respect 0 week in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

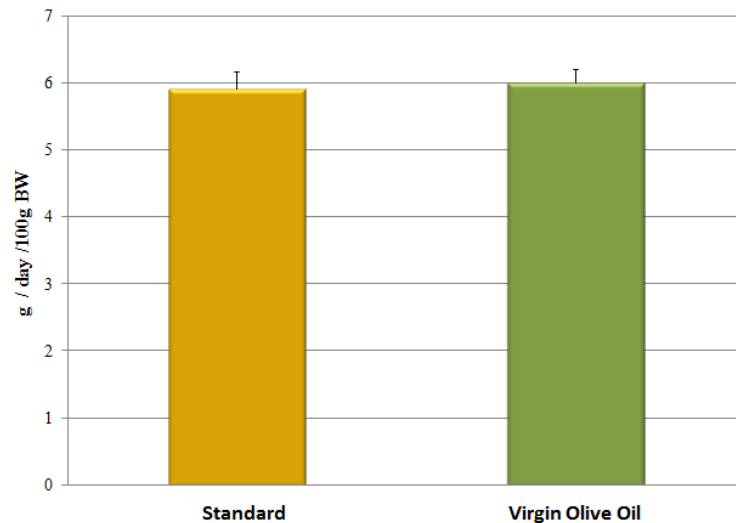


Figure 27: Mean values $\pm$ standard error of food intake (g/day/100g BW) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups.

The weight of total heart and left ventricle did not show differences between S and VOO groups. However, the weight of left kidney of SHR fed a diet enriched in VOO was significantly lower ($p < 0.05$) (by 15% lower) than animals fed a standard diet (Fig 28).

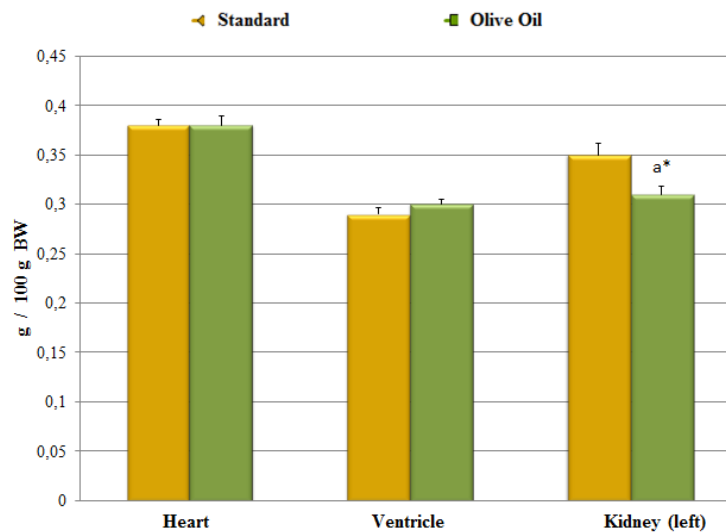


Figure 28: Mean values $\pm$ standard error of heart, ventricle and left kidney weights (g/100g BW) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups. a: differences respect to S group.* $p < 0.05$.

Except for the first two weeks of the feeding period in which the VOO group demonstrated lower water intake levels than S group (Fig 29), in the rest of the period there were no remarkable differences between groups. On the other hand, throughout the feeding period the urine volume was mostly lower in the VOO group (Fig 30).

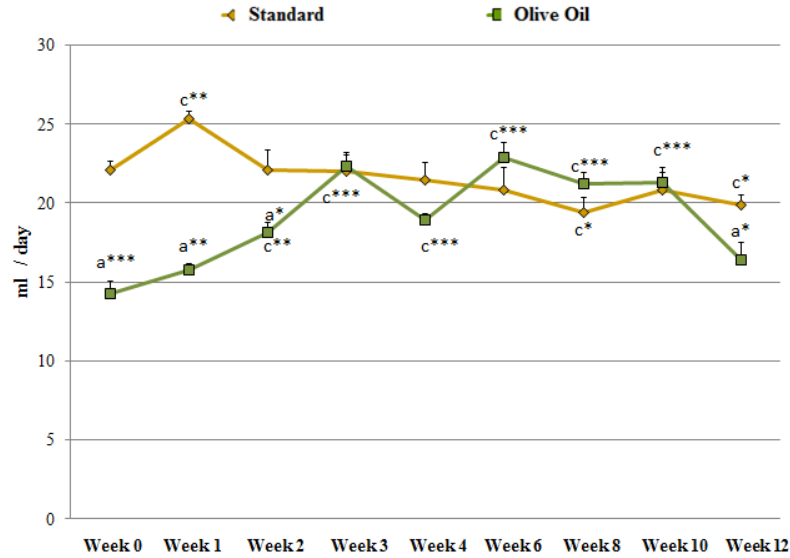


Figure 29: Mean values $\pm$ standard error of water intake (ml/day) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups throughout the experimental period. a: differences between S and VOO groups, c: differences respect 0 week in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

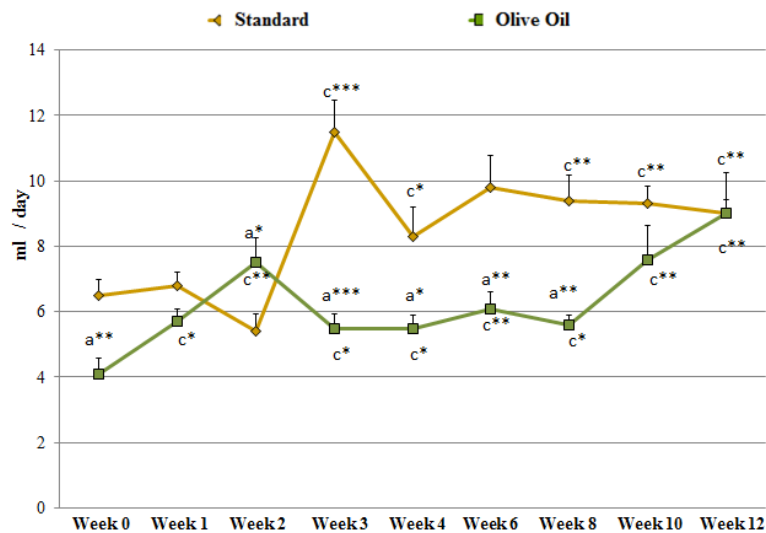


Figure 30: Mean values $\pm$ standard error of diuresis (ml/day) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups, throughout the experimental period. a: differences between S and VOO groups, c: differences respect 0 week in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nitric oxide, at the end of the experimental period, did not show differences between groups in plasma (Fig 31). However, in the middle of the feeding period (week 6) urine levels of nitric oxide were lower ($p < 0.05$) in VOO group than in S (Fig 32).

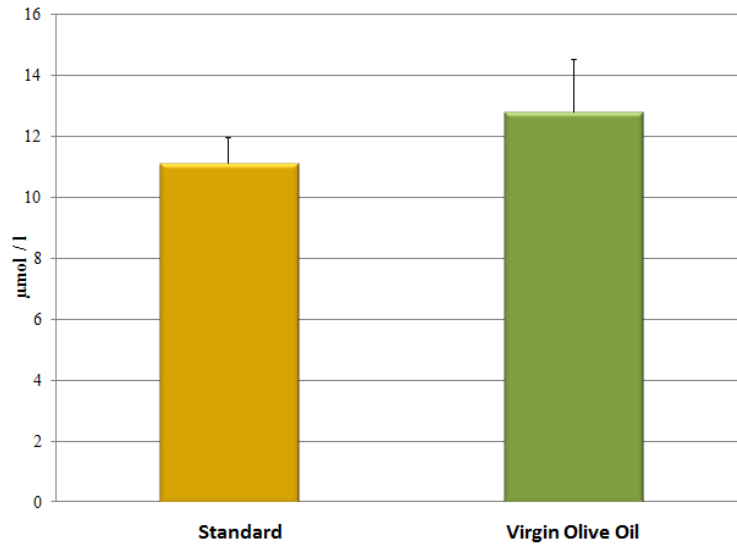


Figure 31: Mean values $\pm$ standard error of plasma nitric oxide ($\mu\text{mol/l}$) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups

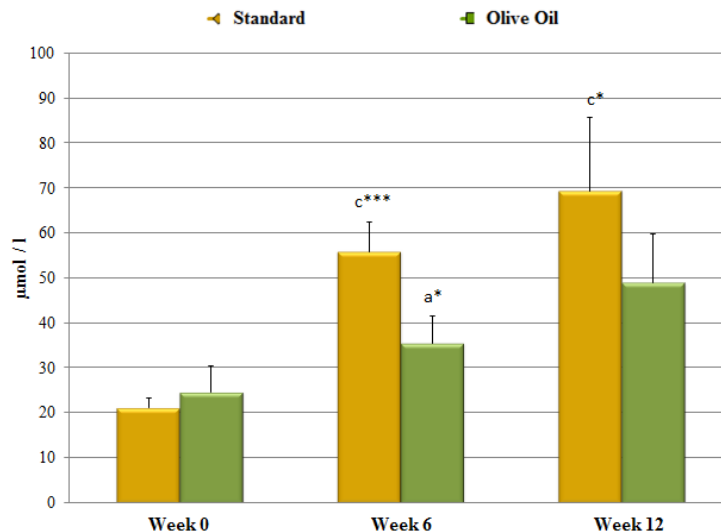


Figure 32: Mean values $\pm$ standard error of urine NO ($\mu\text{mol/l}$) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups, throughout the experimental period. a: differences between S and VOO groups, c: differences respect 0 week in each group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

At the end of the experimental period, the VOO group presented significant ($p < 0.01$) higher levels of glucose in plasma than S group (Fig 33). Glucose tolerance test (Fig 34) demonstrated that plasma glucose levels were always significantly higher in VOO than S in all of the analyzed intervals of time. Glucose levels in S group returned to basal values 90 min after fasting intraperitoneal administration of glucose. However, VOO group did not recuperate the basal levels until 120 min. In addition, the area under curve was significantly higher in VOO than S ($p < 0.001$) (Fig 35) (see also global analysis section).

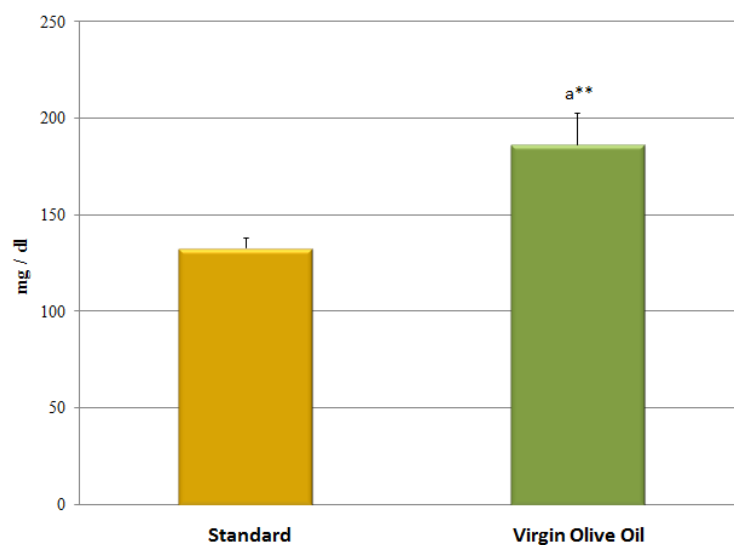


Figure 33: Mean values $\pm$ standard error of fasting plasma glucose (mg/dl) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups. a: differences respect to S group. ** $p < 0.01$.

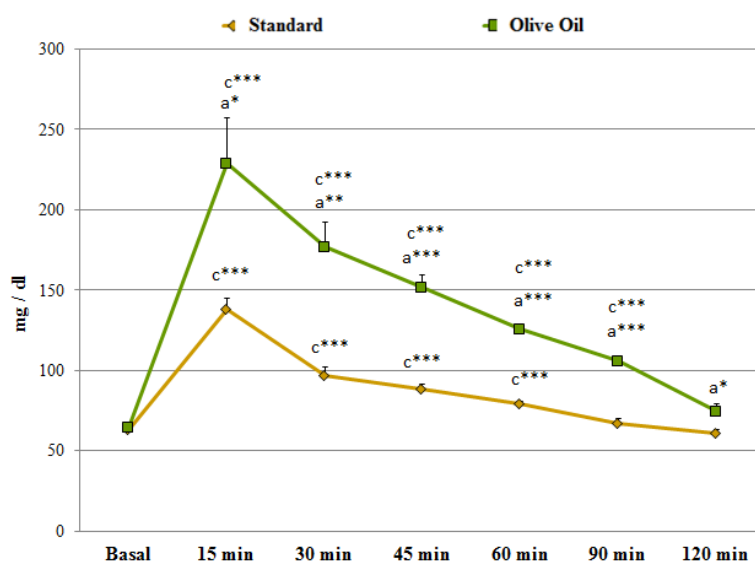


Figure 34: Fasting Glucose Tolerance Test. Mean values $\pm$ standard error of glucose (mg/dl) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups after an intraperitoneal glucose injection (1.5g/Kg BW). a: differences respect to S group, c: differences respect basal levels in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

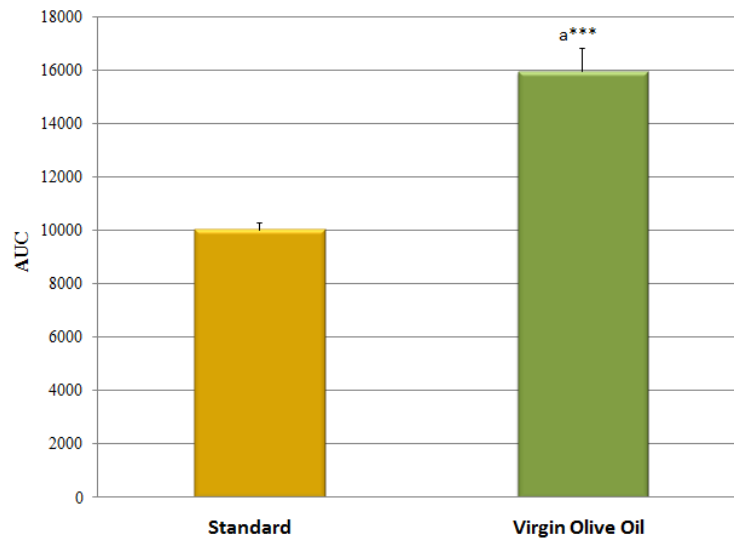


Figure 35: Mean values $\pm$ standard error of AUC (area under curve) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups after an intraperitoneal glucose injection (1.5g/Kg BW). a: differences respect to S group. *** $p < 0.001$.

For lipids determinations in plasma (Figs 36 to 39), except HDL cholesterol that, although exhibited a tendency to increase in VOO, did not reach statistical significance (Fig 36), the rest of parameters such as total cholesterol ($p < 0.01$) (Fig 37), LDL cholesterol ($p < 0.01$) (Fig 38) and triglycerides ($p < 0.01$) (Fig 39) were higher in VOO than S.

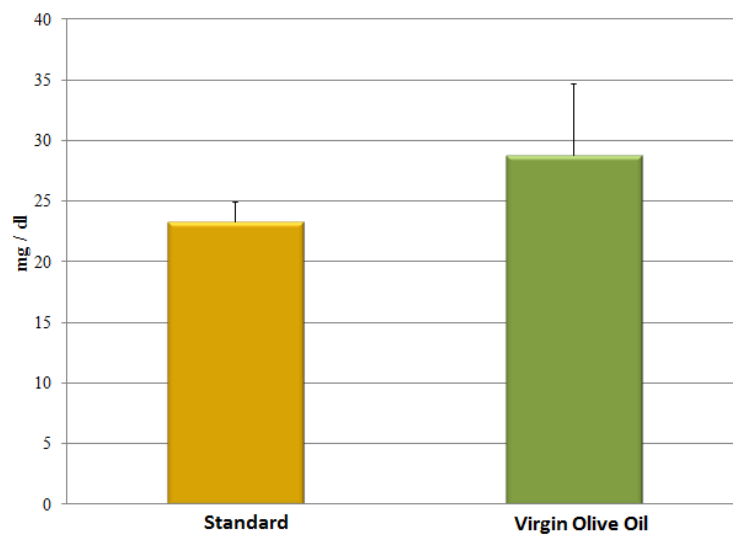


Figure 36: Mean values $\pm$ standard error of plasma HDL cholesterol (mg/dl) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups.

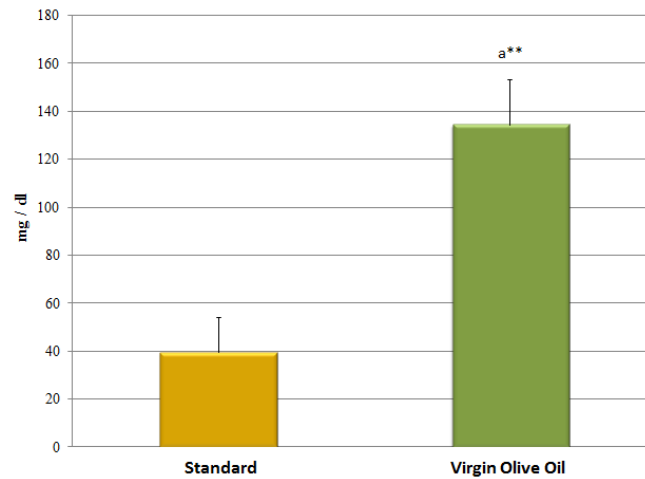


Figure 37: Mean values $\pm$ standard error of plasma total cholesterol (CHO-T, mg/dl) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups. a: differences respect to S group. ** $p < 0.01$.

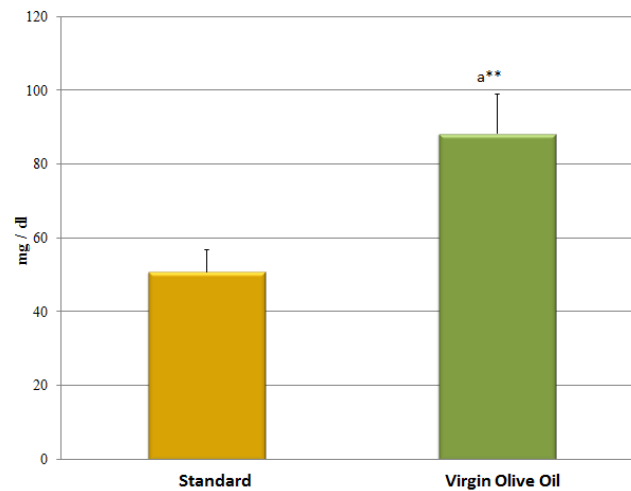


Figure 38: Mean values $\pm$ standard error of plasma LDL cholesterol (mg/dl) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups. a: differences respect to S group. ** $p < 0.01$.

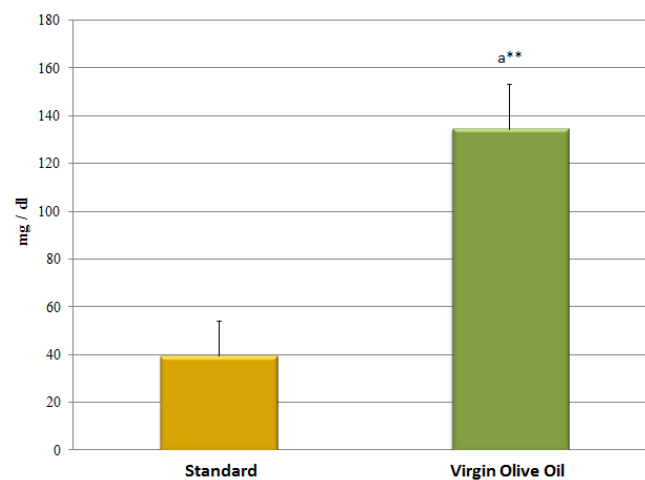


Figure 39: Mean values $\pm$ standard error of plasma Triglycerides (mg/dl) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups. a: differences respect to S group. ** $p < 0.01$.

Finally, the levels of 8-isoprostanes in urine were significantly lower ($p<0.001$) (Fig 40) in VOO group than S.

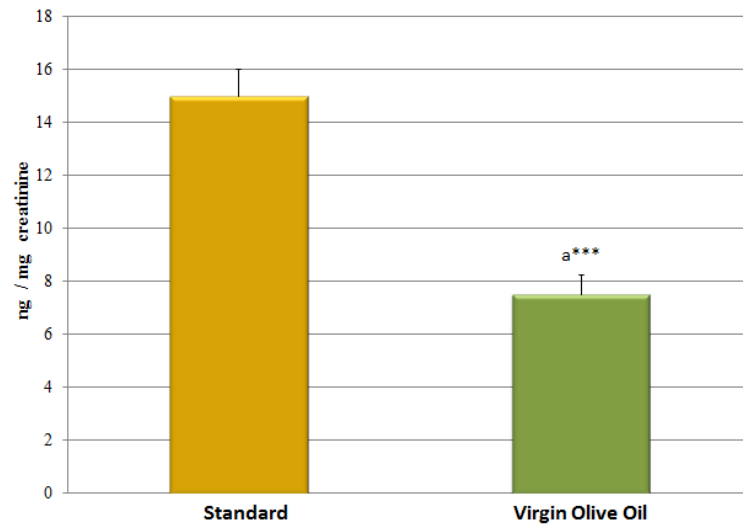


Figure 40: Mean values $\pm$ standard error of urine 8-isoprostanes (ng/mg creatinine) in Standard (S) and Virgin Olive Oil (VOO) groups. a: differences respect to S group. *** $p<0.001$.

4.2. INFLUENCE OF VASOACTIVE COMPOUNDS ON AMINOPEPTIDASE ACTIVITIES IN PLASMA, HYPOTHALAMUS AND KIDNEY

4.2.1. INFLUENCE OF THE ANTIHYPERTENSIVE DRUGS CAPTOPRIL AND PROPRANOLOL

Results are represented in figures 41 to 54

In plasma (Figs 41 and 42), no differences were observed between control and captopril groups for any of the enzymatic activities analyzed. Therefore, these results suggested that there was no predominance of any Ang metabolite in plasma after captopril treatment (scheme 2). These results contrast with the previously obtained in plasma of normotensive rats after captopril treatment in which, while GluAP was unaffected, AspAP decreased and AlaAP and CysAP increased. This suggested an increased formation of Ang IV together with increased vasopressinase activity (*Villarejo et al, 2012*). With regard to propranolol treatment, no differences were observed between control and propranolol groups for AlaAP and CysAP activities. However, GluAP ($p < 0.05$) and AspAP ($p < 0.05$) increased significantly. In consequence, an increased formation of Ang III and Ang 2-10 in plasma may be suggested after propranolol treatment in SHR (scheme 3). These results are contrary to the obtained in plasma of normotensive rats in which aminopeptidase activities decreased after propranolol treatment (unpublished results).

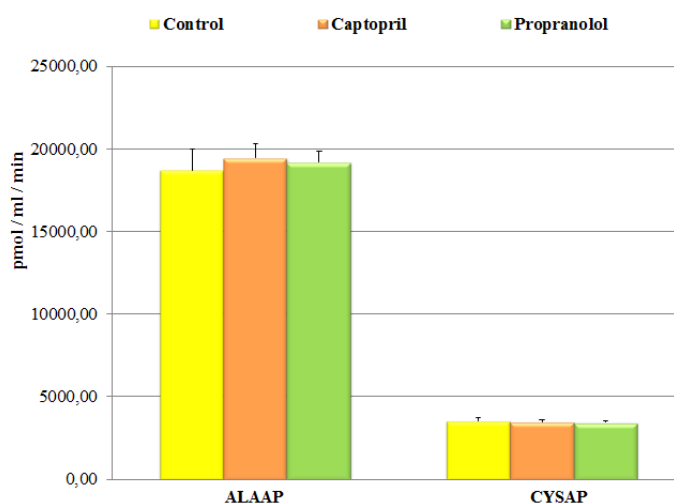


Figure 41: Mean values $\pm$ standard error of plasma Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per ml per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups.

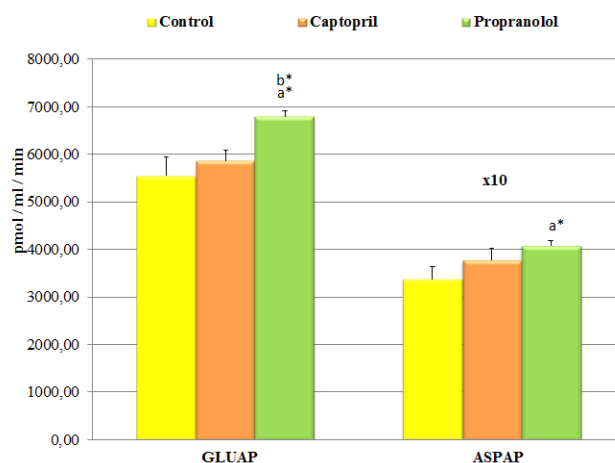


Figure 42: Mean values $\pm$ standard error of plasma Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per ml per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. * $p < 0.05$.

In hypothalamus (Figs 43 to 46), comparing with control animals, except MB AlaAP that decreased significantly, suggesting higher availability of Ang III and Ang IV (scheme 2), the rest of Sol or MB activities did not differ after captopril treatment in SHR. These results differed from the obtained in the hypothalamus of WKY rats where GluAP and AspAP increased, without significant changes in either AlaAP or CysAP (Villarejo *et al*, 2012). After propranolol treatment, in hypothalamus, membrane-bound AlaAP ($p < 0.001$) and AspAP ($p < 0.01$) decreased significantly, suggesting, as occurred with captopril, higher availability of Ang III and Ang IV (scheme 3). These results contrast with normotensive rats that demonstrated increased levels of aminopeptidase activities after propranolol treatment (Ramírez *et al*, 2009).

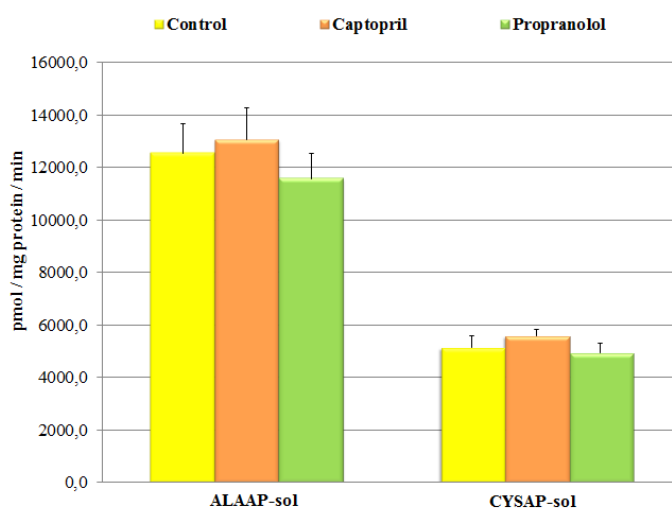


Figure 43: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups.

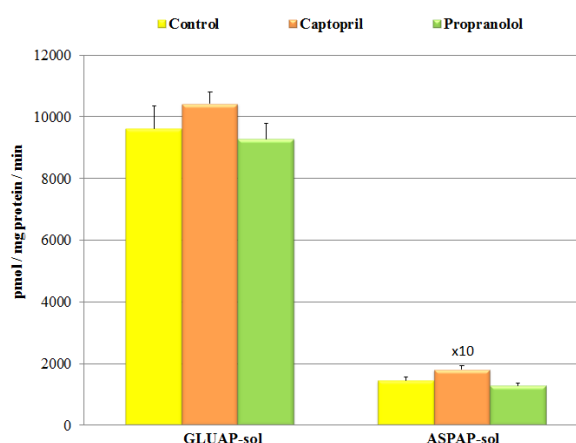


Figure 44: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups.

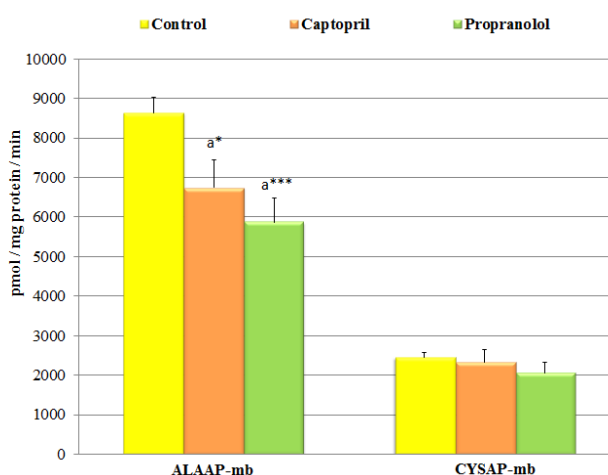


Figure 45: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

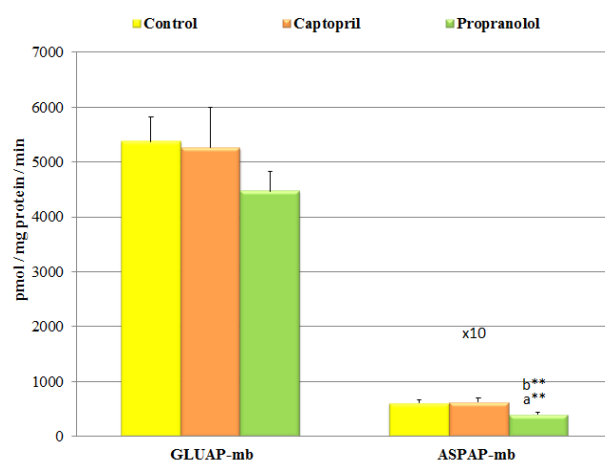


Figure 46: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. ** $p < 0.01$.

The present results, obtained in plasma and hypothalamus of SHR, were contrary to the obtained in hypothalamus and plasma of normotensive rats and suggested an inverse neuroendocrine response of the renin-angiotensin system to propranolol treatment in normotensive and hypertensive rats (*Ramírez et al, 2011*).

In renal cortex (Figs 47 to 50) and renal medulla (Figs 51 to 54) of SHR, there was almost a generalized significant decrease after captopril treatment in the aminopeptidase activities investigated. This suggests that there is not predominance of a particular Ang metabolite in kidney, were we could expect a general RAS inhibition after captopril treatment which, is in agreement with previous reports (*Hu et al., 1996*) (scheme 2). However in normotensive animals (*Villarejo et al, 2012*), although we could observe a tendency to increase in renal cortex, this not reached statistical significance in any enzymatic activities tested, but all of them, as observed in SHR, significantly decrease in the inner medulla. After propranolol treatment, in renal cortex of SHR, except for soluble GluAP and AspAP that did not change, the rest of soluble and membrane-bound enzymatic activities analyzed decreased their levels (Figs 47 to 50). These results suggested an inhibition of the RAS in renal cortex of SHR under propranolol treatment (scheme 3). No data on the influence of propranolol on kidney aminopeptidase activities in normotensive animals have been yet reported. In renal medulla (Figs 51 to 54), only membrane-bound AspAP decreased significantly ($p<0.001$) after propranolol treatment in SHR (scheme 3).

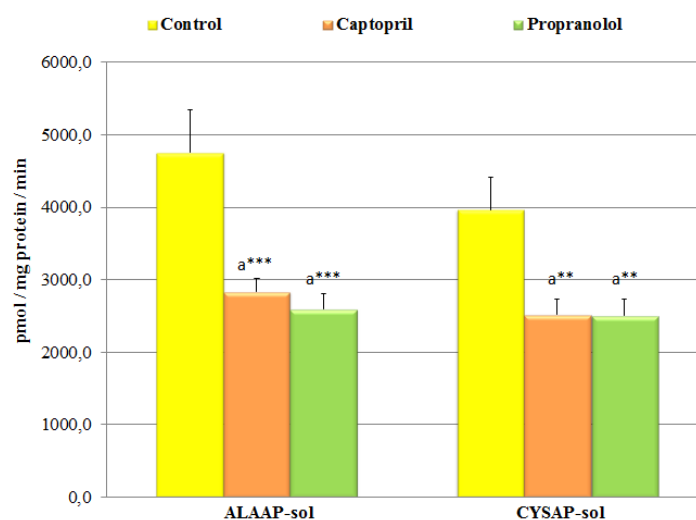


Figure 47: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

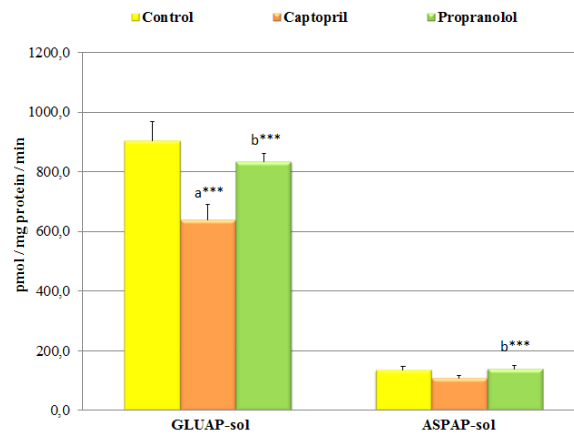


Figure 48: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. *** $p < 0.001$.

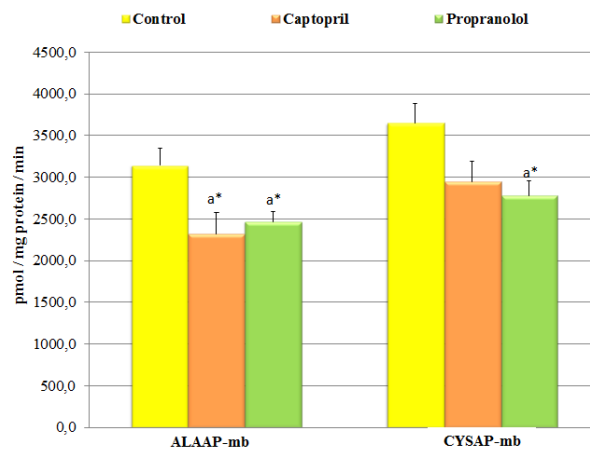


Figure 49: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$.

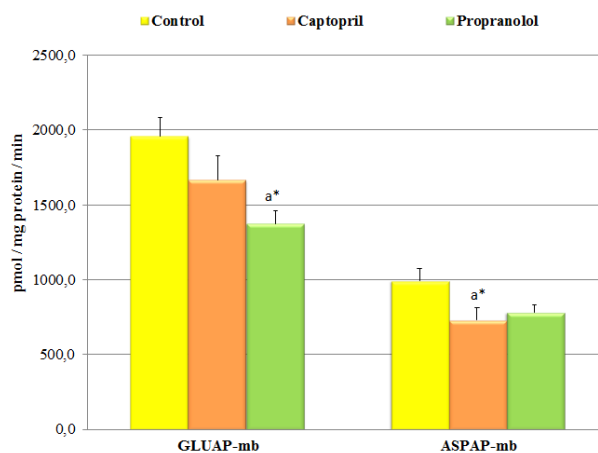


Figure 50: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$.

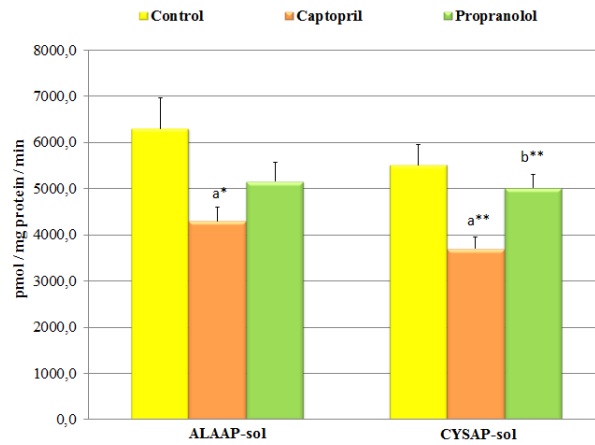


Figure 51: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group, b: differences between CA and P groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

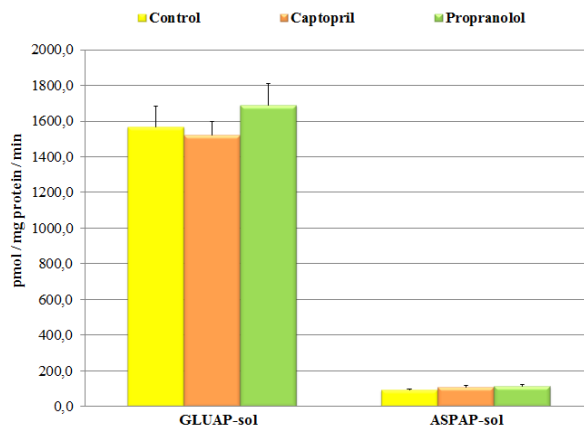


Figure 52: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups.

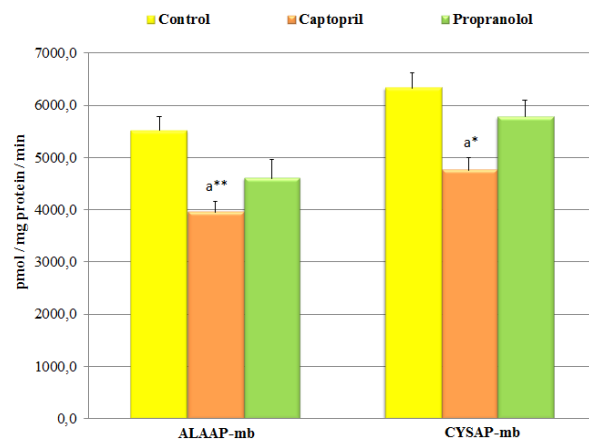


Figure 53: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

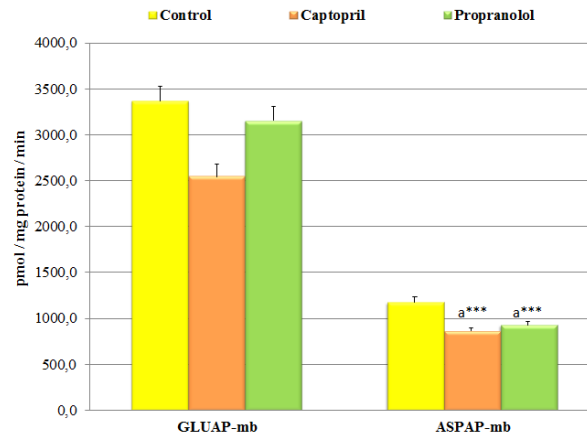
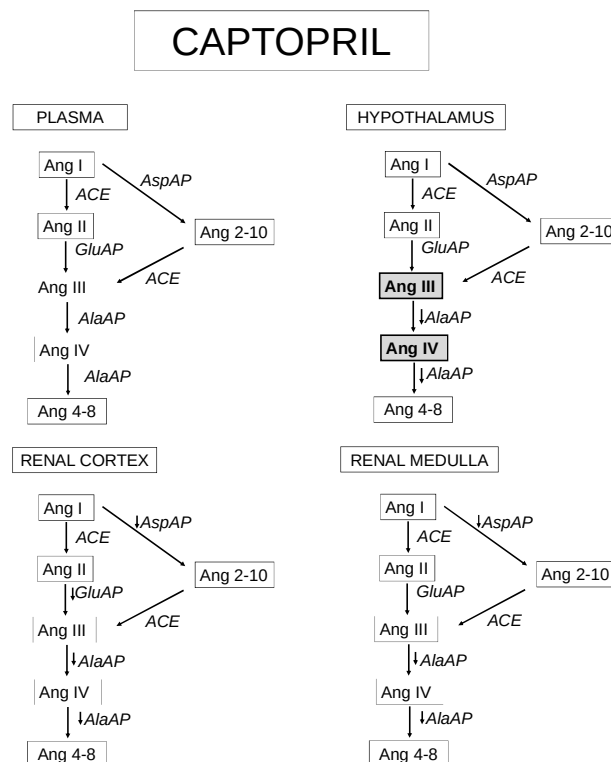


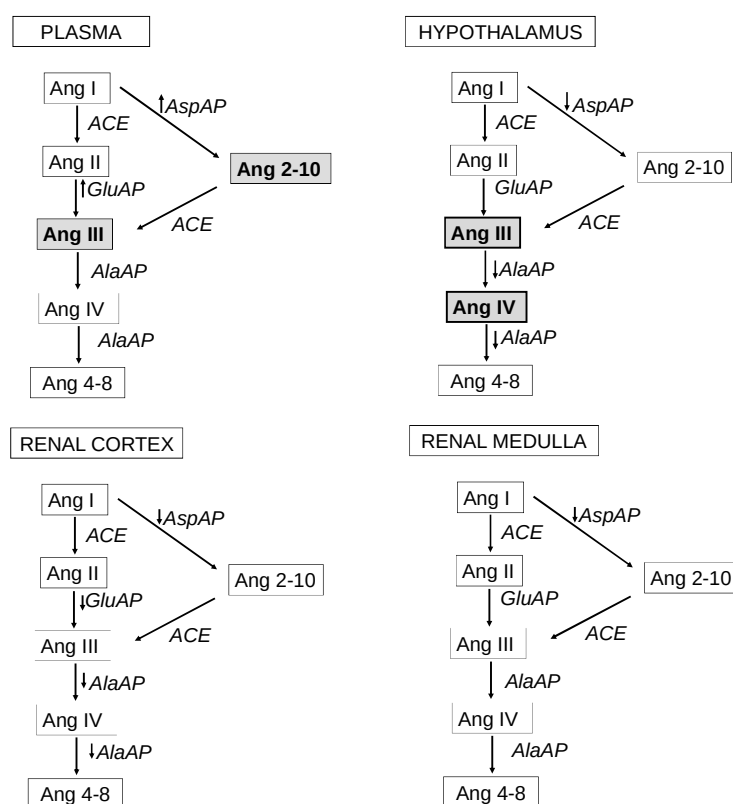
Figure 54: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C), Captopril (CA) and Propranolol (P) groups. a: differences respect to C group. *** $p < 0.001$.

The present results clearly demonstrated a differential response, mainly in plasma and hypothalamus, between both rat strains: WKY and SHR. However, this difference did not influence in the reduction of SBP observed in both strains after captopril treatment: around 20% of reduction in both WKY (Villarejo *et al*, 2012) and SHR



Scheme 2. Partial representation of the renin-angiotensin system after Captopril treatment in plasma, hypothalamus, renal cortex and renal medulla. The increase or decrease of the corresponding AP activity is indicated with arrows. The active Ang metabolites apparently activated by Captopril in each location of hypertensive male rats are highlighted in bold. See text for abbreviations.

PROPRANOLOL



Scheme 3. Partial representation of the renin-angiotensin system after Propranolol treatment in plasma, hypothalamus, renal cortex and renal medulla. The increase or decrease of the corresponding AP activity is indicated with arrows. The active Ang metabolites apparently activated by Propranolol in each location of hypertensive male rats are highlighted in bold. See text for abbreviations.

4.2.2. INFLUENCE OF THE INHIBITION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION BY L-NAME

Results are represented in figures 55 to 68.

In plasma, due to decreased ($p < 0.001$) levels of GluAP after L-NAME treatment, there was a prevalence of Ang II in normotensive (unpublished results) but not in hypertensive rats where there were no changes in aminopeptidase activities after L-NAME treatment (Figs 55 and 56) (scheme 4).

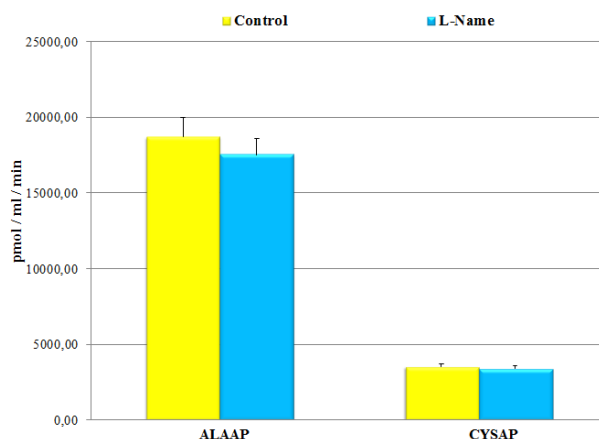


Figure 55: Mean values $\pm$ standard error of plasma Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per ml per minute, in Control (C) and L-Name groups.

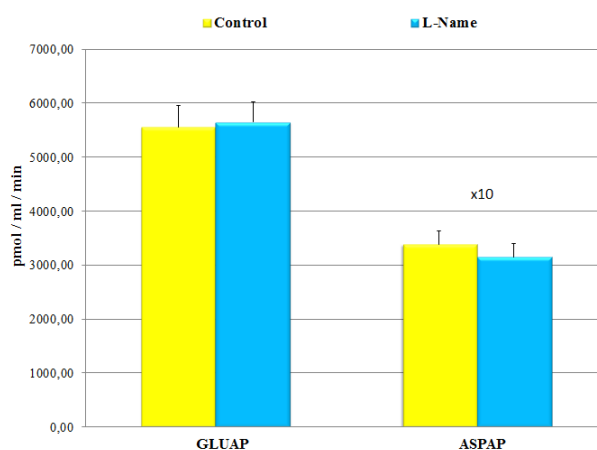


Figure 56: Mean values $\pm$ standard error of plasma Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per ml per minute, in Control (C) and L-Name groups.

In hypothalamus, while in normotensive rats the results suggested a predominance of Ang IV formation in hypothalamus of L-NAME treated rats (*Segarra et al., 2010*), in SHR (Figs 57 to 60), since membrane-bound AlaAP and AspAP activities decreased significantly ($p < 0.01$), suggested a longer action of Ang III and Ang IV (*Vives et al., 2011*) (scheme 4). These results, as was observed

after propranolol treatment, suggested a different autonomic response in Wistar and SHR rats under L-NAME treatment.

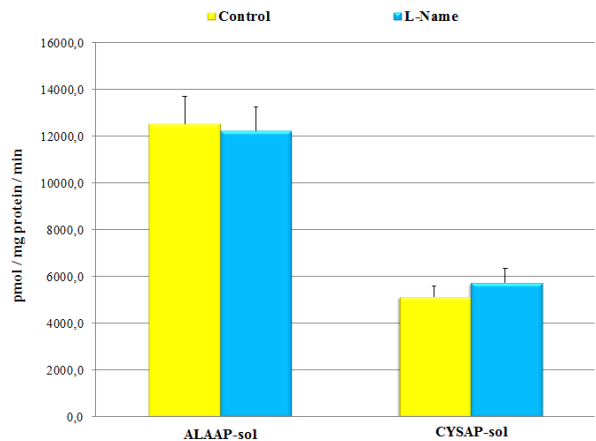


Figure 57: Mean values ± standard error of soluble Alanine (ALAAP) and Cystine (CYSAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl-β-naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups.

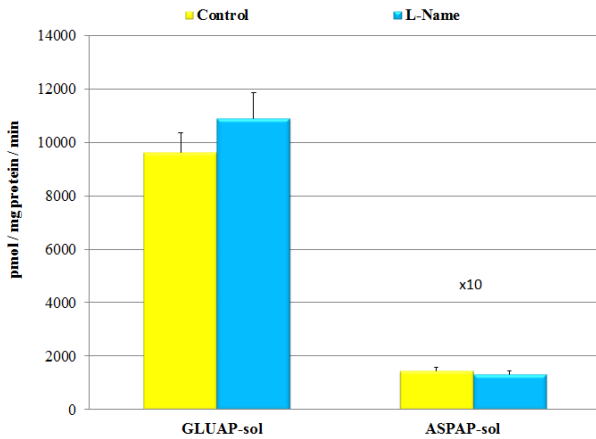


Figure 58: Mean values ± standard error of soluble Glutamine (GLUAP) and Aspartate (ASPAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl-β-naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups.

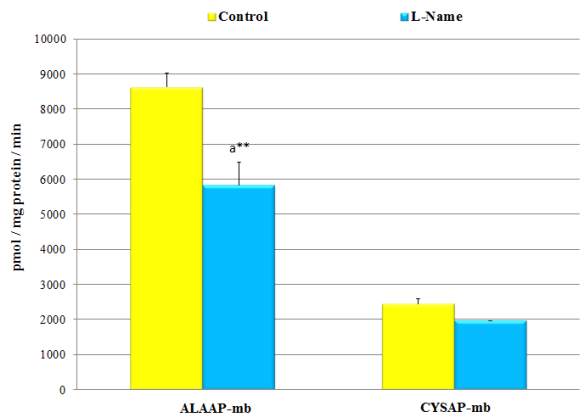


Figure 59: Mean values ± standard error of membrane-bound Alanine (ALAAP) and Cystine (CYSAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl-β-naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. **p<0.01.

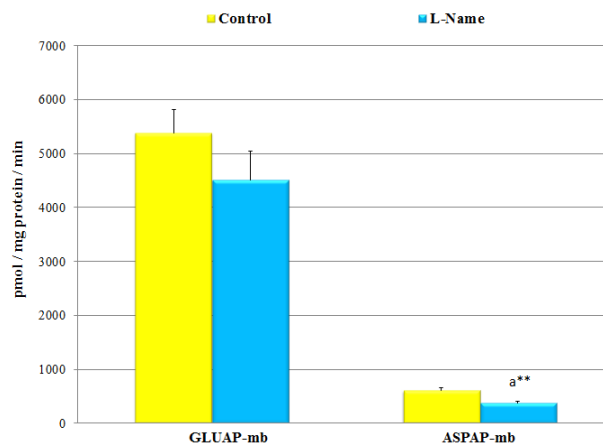


Figure 60: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups.

In renal cortex (Figs 61 to 64), while soluble aminopeptidase activities decreased significantly after L-NAME treatment, membrane-bound did not change. In renal medulla (Figs 65 to 68), soluble CysAP ($p < 0.01$) and membrane-bound AspAP ($p < 0.001$) decreased significantly after L-NAME treatment. This suggested higher availability of antidiuretic hormone at this level, which would imply an increase in water reabsorption that may contribute to the high SBP levels developed in these animals after L-NAME treatment. The rest of enzymatic activities determined in renal medulla did not change (scheme 4). These results are similar to the obtained after peripheral sympathetic blockade with propranolol that was indicated previously. This is in agreement with the existence of a sympathetic suppression previously described for L-NAME treated rats (*Liu et al, 1998*).

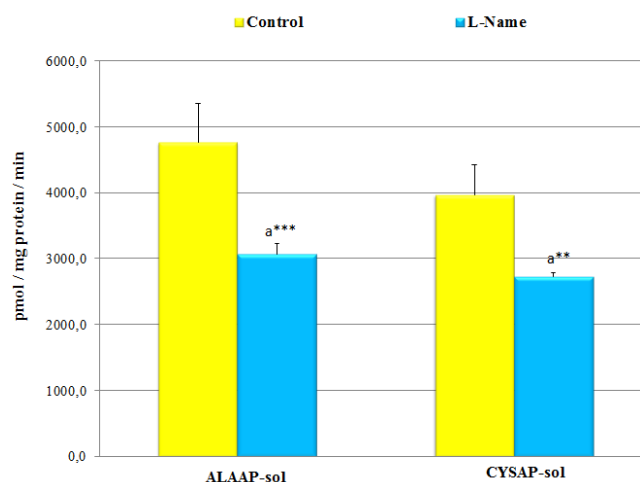


Figure 61: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$.

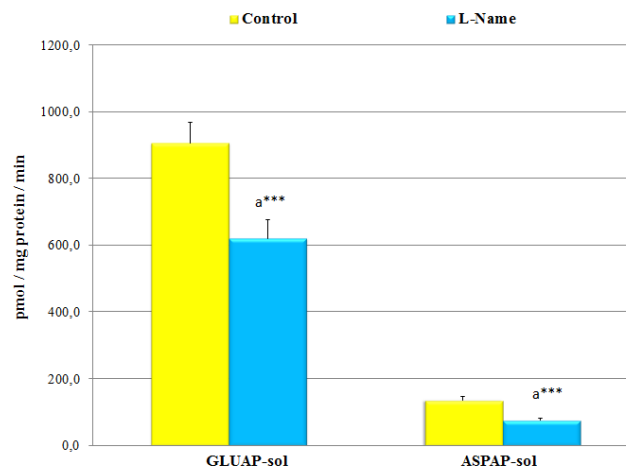


Figure 62: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. *** $p < 0.001$.

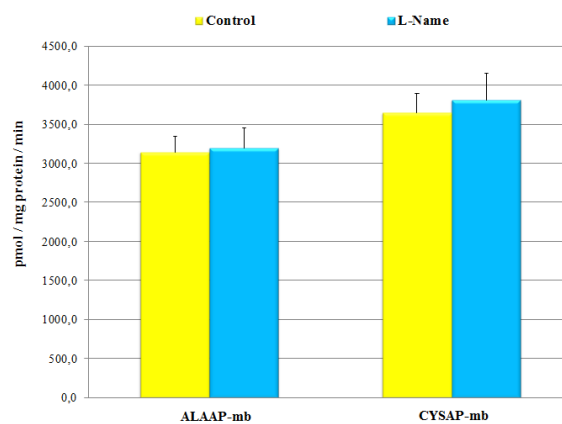


Figure 63: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanine (ALAAP) and Cystine (CYSAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups.

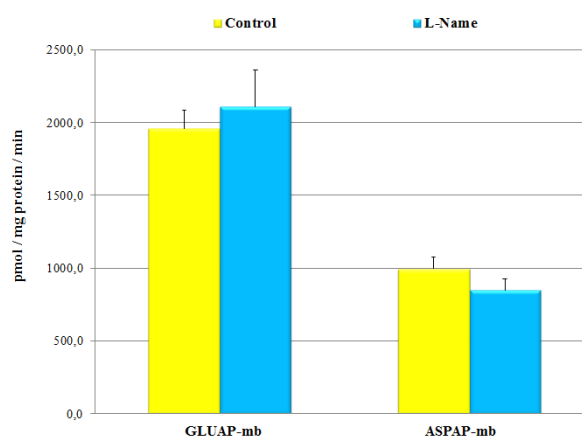


Figure 64: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups

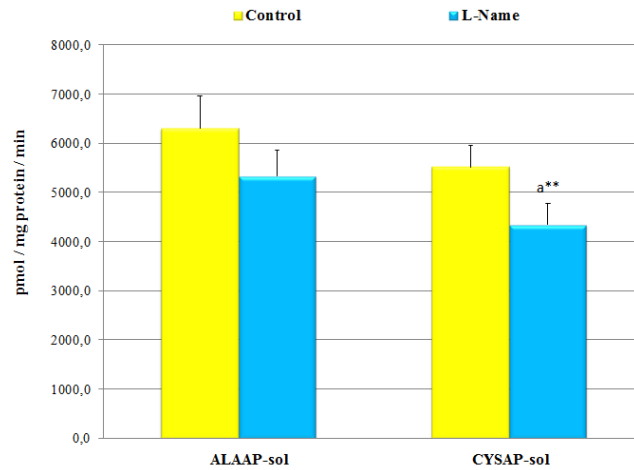


Figure 65: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups. a: differences respect to C group. ** $p < 0.01$.

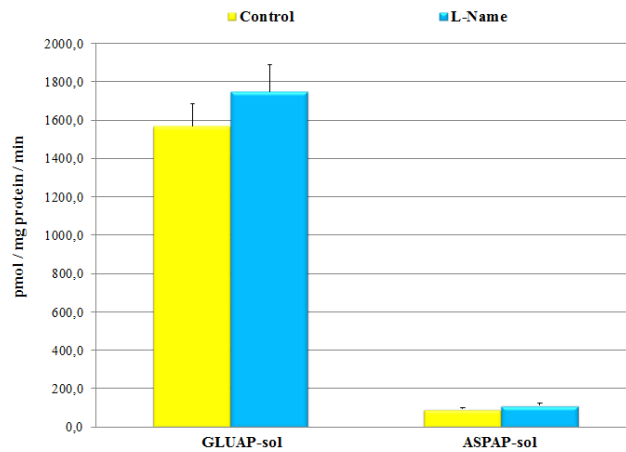


Figure 66: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups.

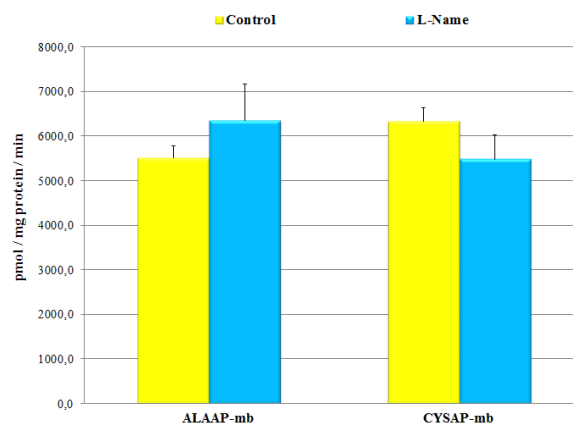


Figure 67: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups

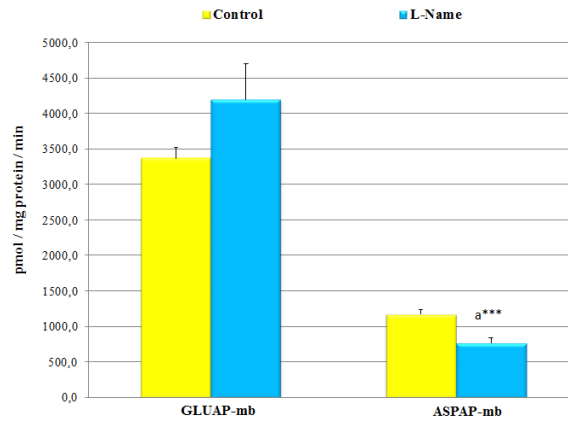
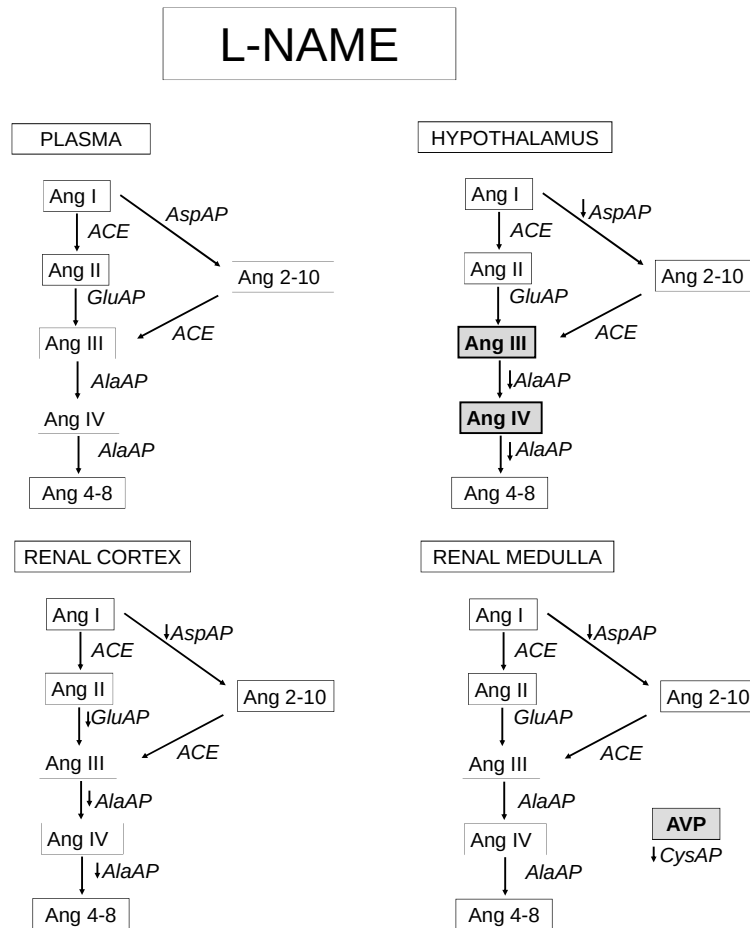


Figure 68: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Control (C) and L-Name groups. a. *** $p < 0.001$.



Scheme 4. Partial representation of the renin-angiotensin system after L-NAME treatment in plasma, hypothalamus, renal cortex and renal medulla. The increase or decrease of the corresponding AP activity is indicated with arrows. The active Ang metabolites apparently activated by L-NAME in each location of hypertensive male rats are highlighted in bold. The possible increased action of AVP in renal medulla is also indicated. See text for abbreviations.

4.2.3. INFLUENCE OF A DIET ENRICHED WITH EXTRA VIRGIN OLIVE OIL

Results are represented in figures 69 to 82

No differences were observed between animals fed a standard diet and fed a diet enriched with virgin olive oil in the aminopeptidase activities assayed from plasma (Figs 69 and 70), hypothalamus (Figs 71 to 74) or the soluble activities determined in renal cortex (Figs 75 and 76) and renal medulla (Figs 79 and 80). However, remarkably, only significant differences were observed in the renal cortex (Figs 77 and 78) and in the inner medulla (Figs 81 and 82) selectively for membrane-bound activities. In renal cortex, AlaAP ($p < 0.05$) and AspAP ($p < 0.05$) increased significantly, which may suggest a higher metabolism of Ang III and Ang IV and higher formation of Ang 2-10 in this group (scheme 5). It was reported a noticeable intraglomerular conversion of Ang I to Ang 2-10 which, may be critical to counterbalance the local actions of Ang II (*Velez et al, 2009*). Therefore, a diet enriched in VOO may increase the local production of Ang 2-10 at glomerular level compensating the negative actions of Ang II. In renal medulla, while AlaAP increased significantly ($p < 0.01$), GluAP ($p < 0.05$) and AspAP ($p < 0.01$) decreased. These results suggested an increased metabolism for Ang III and Ang IV but a lower metabolism for Ang II that would exert a longer effect under these conditions (scheme 5). It has been described that in the inner medulla, urea transport is enhanced by Ang II, contributing to increased sodium and water reabsorption (*Burns and Li, 2003*) which, would be in agreement with the reduced levels of diuresis observed during the most part of the feeding period (Fig 30). However this argumentation contrast with the reduced BP observed during the feeding period (Fig 23). Therefore, the present results suggest an opposite response between renal cortex and medulla: while in renal cortex Ang II may be counterbalanced, in renal medulla may be potentiated. In consequence, to explain the beneficial influence on BP of the diet enriched in VOO, other factors such as modifications in vascular resistance or cardiac output may be involved.

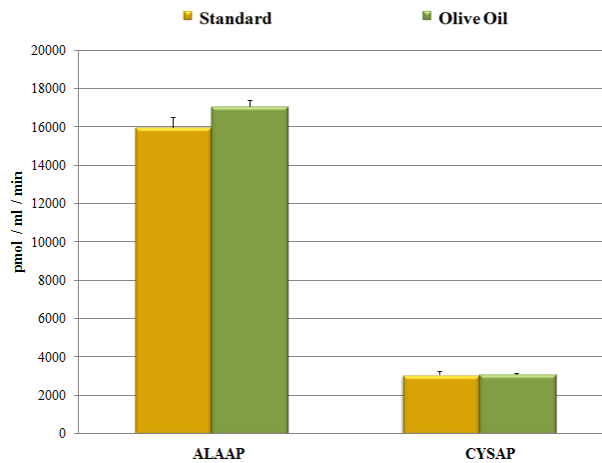


Figure 69: Mean values $\pm$ standard error of plasma Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per ml per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

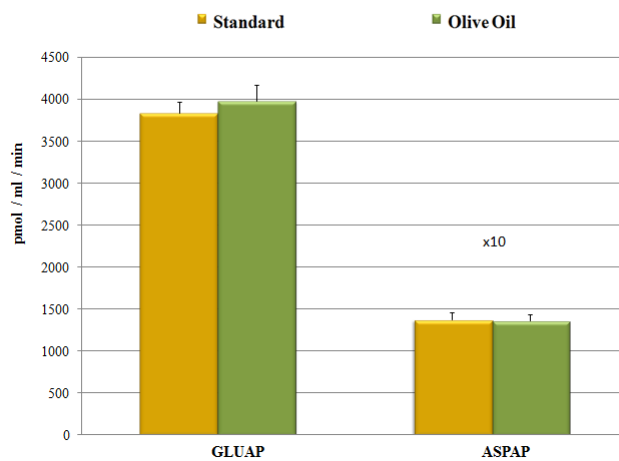


Figure 70: Mean values $\pm$ standard error of plasma Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per ml per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

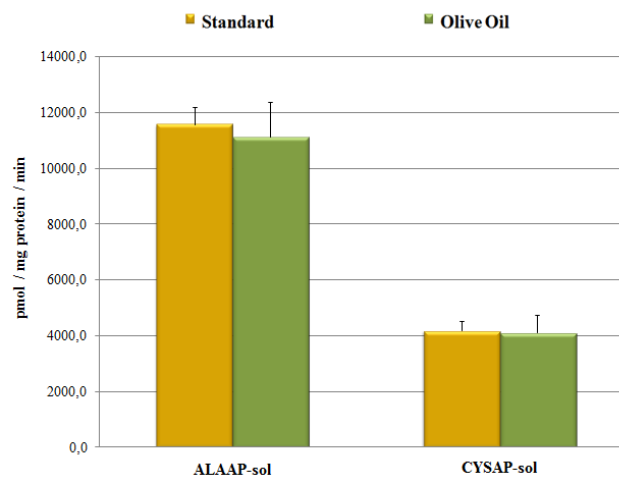


Figure 71: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

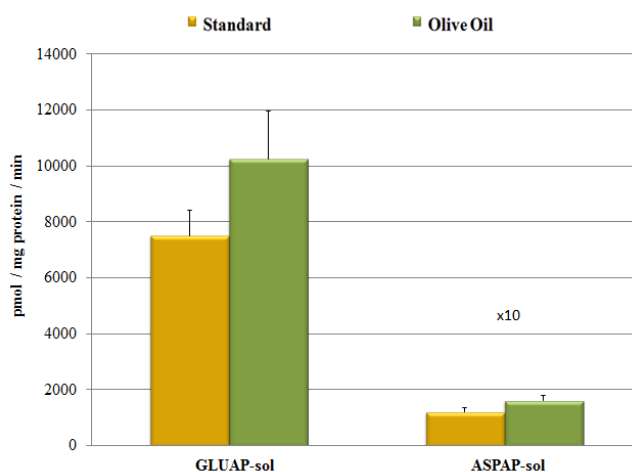


Figure 72: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

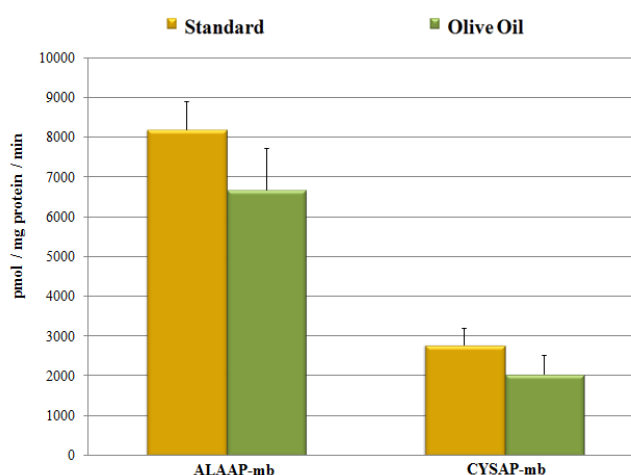


Figure 73: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

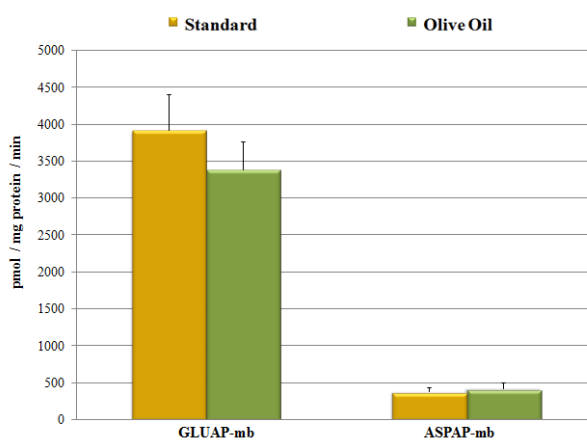


Figure 74: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in hypothalamus, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

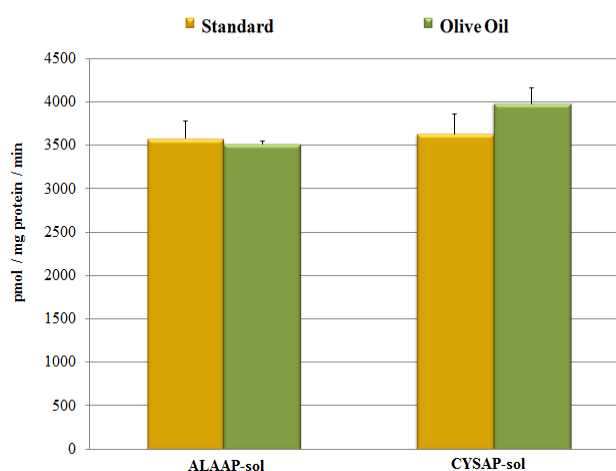


Figure 75: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

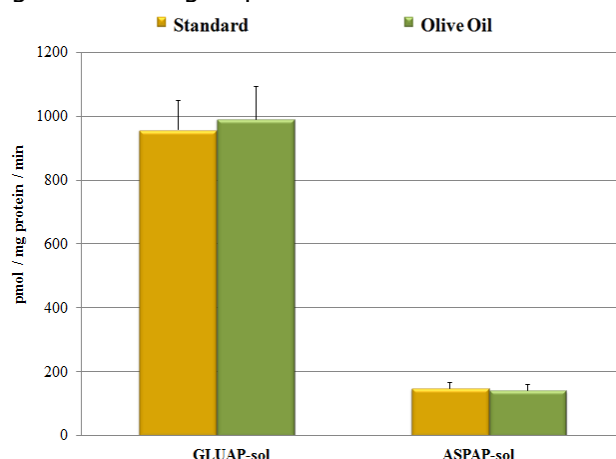


Figure 76: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

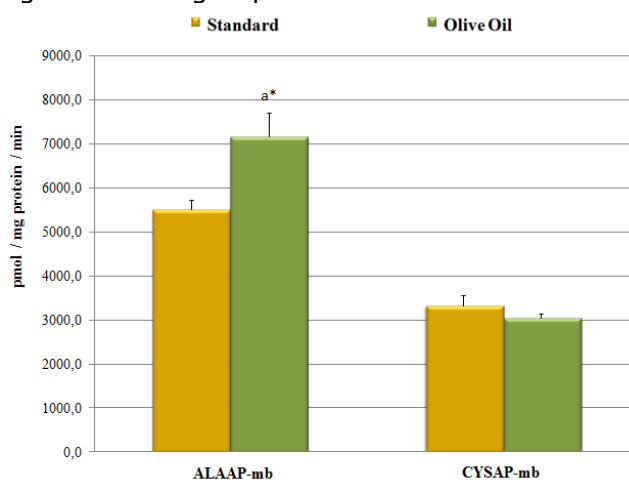


Figure 77: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups. a: differences respect to Standard group. * $p < 0.05$.

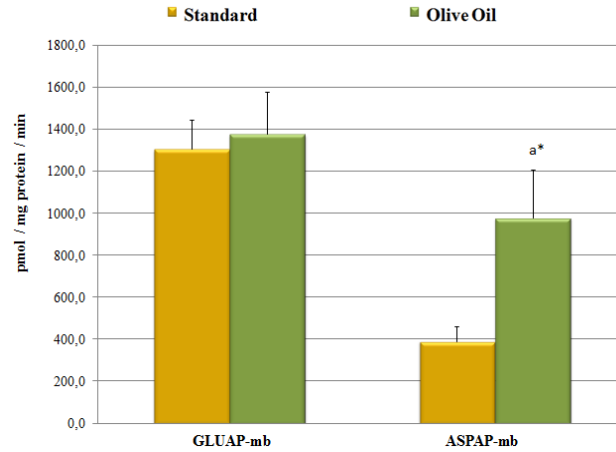


Figure 78: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal cortex, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups. a: differences respect to Standard group. * $p < 0.05$.

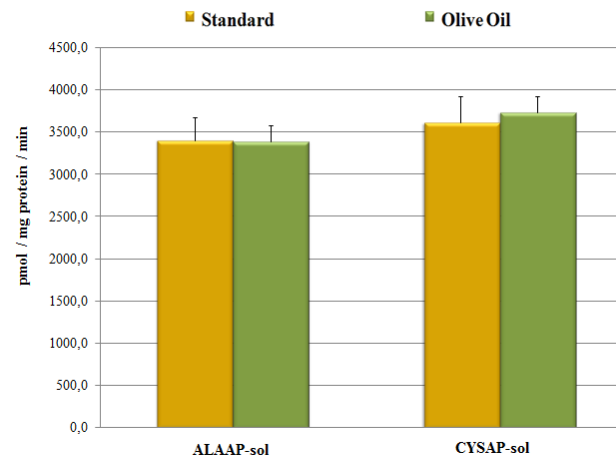


Figure 79: Mean values $\pm$ standard error of soluble Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

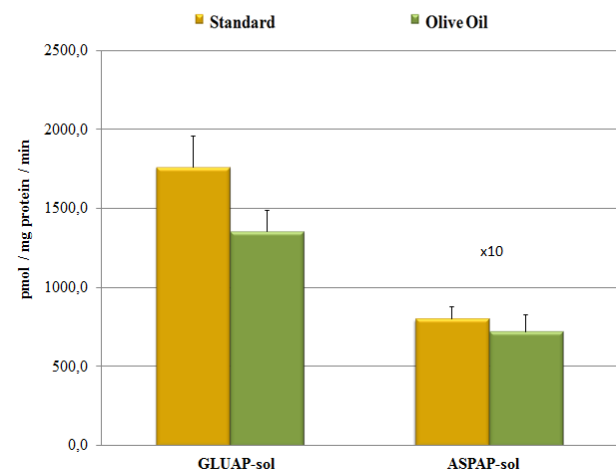


Figure 80: Mean values $\pm$ standard error of soluble Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphthylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups.

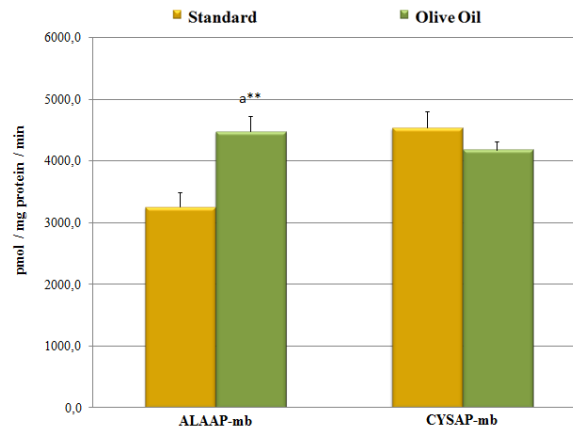


Figure 81: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Alanyl (ALAAP) and Cystinyl (CYSAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups. a: differences respect to Standard group. ** $p < 0.01$.

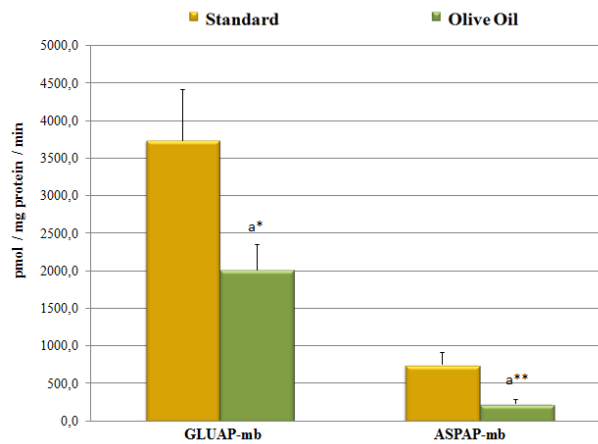
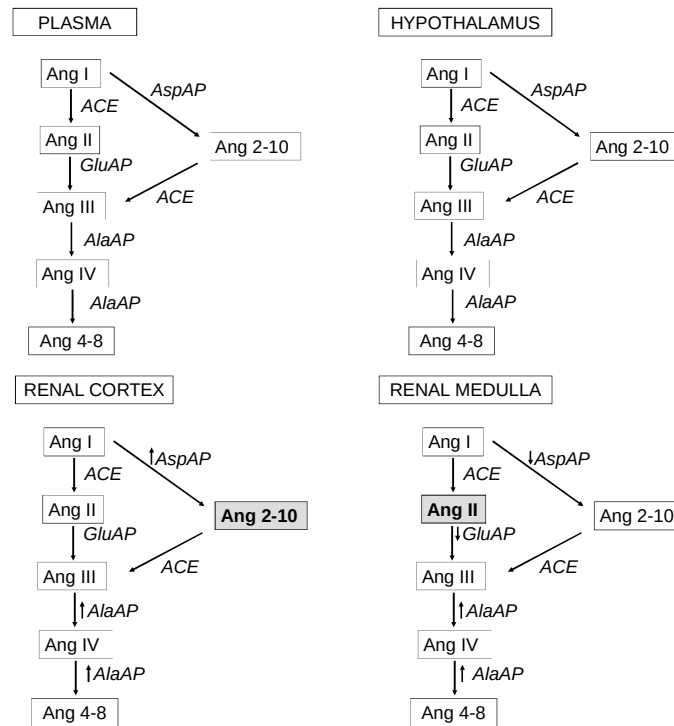


Figure 82: Mean values $\pm$ standard error of membrane-bound Glutamyl (GLUAP) and Aspartyl (ASPAP) aminopeptidase activities in renal medulla, expressed as pmoles of the corresponding aminoacyl- β -naphtylamide hydrolyzed per mg of protein per minute, in Standard and Virgin Olive Oil groups. a: differences respect to Standard group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

VIRGIN OLIVE OIL



Scheme 5. Partial representation of the renin-angiotensin system after fed a diet enriched in VOO in plasma, hypothalamus, renal cortex and renal medulla. The increase or decrease of the corresponding AP activity is indicated with arrows. The active Ang metabolites apparently activated by the diet in each location of hypertensive male rats are highlighted in bold. See text for abbreviations.

5. GLOBAL ANALYSIS

A summary of the results obtained in the present research are indicated in tables 5 and 6 and in schemes 2 to 5.

Regarding the influence of the different treatments on physiologic and metabolic parameters, the pattern of response differed depending on the treatment. In general terms, as expected, the main deleterious effects were observed after L-NAME treatment showing increased levels of 8-isoprostanes, SBP, cardiac and renal hypertrophy. These effects, as well as the observed on AP activities (see later), are presumably consequence of the great imbalance between hypertensive and hypotensive agents that results after the inhibition of the synthesis of one of the major vasodilators, such as NO. However, it is particularly remarkable the increased levels of glucose and lipids, as well as the anomalous glucose tolerance test (GTT) with a higher area under curve (AUC), in animals fed a diet enriched with VOO in comparison with rats fed a standard diet. Other authors also found similar results. For example, Hoefel et al. (2011) in a research comparable to our present work studied four groups of rats fed during 16 weeks with normocaloric, hypercaloric olive oil, hypercaloric saturated fat and normocaloric saturated fat diets. These authors found that rats with a diet enriched in olive oil had an altered GTT with an AUC greater than the observed in the other groups. They suggested a decreased insulin secretion after a chronic exposure to high levels of oleic acid. In the same way, we could speculate that since these animals were under a chronic high fat diet (consequently low in carbohydrates) they adapted their metabolism to obtain energy from the elevated fatty acids and not from glucose. Therefore, when we administrated an acute overload of glucose for the GTT, the β -cell response was anomalous and the return to the basal levels of glucose was delayed. Further research should clarify these hypotheses.

Regarding the effects of drug treatments or diets on AP activities, the pattern of response differed depending on the treatment, the tissue analyzed and, according to other available data, depending on the strain WKY or SHR used in the study. As was previously pointed out in the introduction and as it is demonstrated with the present results, the actions of vasoactive compounds on BP may be the results of other effects than the ones initially established. For example, the reduction of Ang II production by the administration of ACE inhibitors such as captopril, the sympathetic blockade by adrenergic antagonists such as propranolol or the blockade of the formation of NO by the administration of L-NAME. These compounds may modify in parallel different pathways of the RAS, resulting in the activation or inhibition of several active Ang metabolites, which may interact each other leading to a particular influence on BP. A deep knowledge of the modifications of the different steps of the RAS

under classic treatments or under diets that have demonstrated a cardiovascular influence may be important in order to improve the current therapeutic approaches for the treatment of hypertension. Particularly, the use of ACE inhibitors might be enhanced by the parallel use of strategies that favor the action of Ang metabolites that counteract for example Ang II at systemic level or Ang III at central level. In addition, as was already demonstrated, the use of inhibitors of GluAP (AP A) at central level is useful to reduce the formation of Ang III and consequently the stimulation of the ADH release (*Bodineau et al.*, 2008). In this way, alternatively or in parallel, it could be suggested the beneficial effect of the central activation of AlaAP (metabolizing in consequence Ang III), or the systemic inhibition of AlaAP that would increase the availability of Ang III that may counteract Ang II in the periphery (*Danziger*, 2008). Therefore, following this argumentation, our present results suggested for example, higher availability of Ang III in hypothalamus of SHR treated with captopril (due to decreased AlaAP activity). Since Ang III has demonstrated to stimulate the release of AVP (*Zini et al.*, 1996), the concomitant use of central GluAP inhibitors (*Bodineau et al.*, 2008) and/or the use of AlaAP (AP N) stimulators (*Danziger*, 2008) might maximize the antihypertensive effect of captopril. Again, it is necessary to take into account that the inhibition of the formation of Ang III at central level by the use of a GluAP inhibitor, may lead to the modification of the rest of the system influencing in the activation or inhibition of other Ang metabolites.

Regarding L-NAME treatment, as previously indicated, it reduces NO formation, which results in an important disruption in the physiologic balance between agents that increase or decrease blood pressure. Therefore, it is interesting to analyze the consequences of the selective inhibition in the formation of NO. According with the present results, the deleterious effect of L-NAME treatment may be due in part to the reduction of AlaAP activity in hypothalamus that may results in higher availability of Ang III that in turn would stimulate AVP release from the posterior pituitary. This hypothesis does not agree with the increased levels of urine volume observed in these animals but is in agreement with the induction of cardiac hypertrophy by AVP (*Yang et al.*, 2003).

Regarding the influence of a diet enriched in VOO on AP activities, we could suggest a positive effect on renal cortex increasing the formation of Ang 2-10 and a negative influence on renal medulla leading to higher availability of Ang II as previously discussed. Therefore, we could speculate that a hypertensive patient may benefit from a diet rich in VOO along with a pharmacologic treatment with captopril, which would maximize the final effect on BP.

Treatment/ Parameter	CA	P	LN	VOO
NO	=	=	↓	=
8-I	=	↓	↑	↓
SBP	↓	=	↑	↓
Glucose	=	=	=	↑
Lipids	=	↑TG =rest	↑TG =rest	↑TC ↑TG ↑LDL =HDL
BW	=	↓	=	=
THW	↓	=	↑	=
LVW	↓	=	↑	=
LKW	=	=	↑	↓
FI	=	↓	=	=
WI				
UV	↑	=	↑	↓

Table 5. Physiologic and metabolic parameters in SHR after oral administration of captopril (CA), propranolol (P) and L-NAME (LN) during four weeks, and after fed a diet enriched with virgin olive oil (VOO) during twelve weeks. NO, nitric oxide; 8-I, 8-isoprostanes; SBP, systolic blood pressure; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; LDL, low density lipoproteins; HDL, high density lipoproteins; BW, body weight; THW, total heart weight; LVW, left ventricle weight; LKW, left kidney weight; FI, food intake; WI, water intake; UV, urine volume.

Treatment	CA		P		LN		VOO	
Strain/ Tissue	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY
PLASMA	=	↓AspAP ↑AlaAP ↑CysAP ¹	↑GluAP ↑AspAP ↑ <i>Ang 2-10</i> ↑ <i>Ang III</i>	↓AP ²	=	↓GluAP ↑ <i>Ang II</i> ⁴	=	
HYPOTHALAMUS	↓MBAIaAP ↑ <i>Ang III</i> ↑ <i>Ang IV</i>	↑MBGluAP ↑MBAspAP ↑ <i>Ang 2-10</i> ↑ <i>Ang III</i> ¹	↓MBAIaAP ↓MBAspAP ↑ <i>Ang III</i> ↑ <i>Ang IV</i>	↑AP ³	↓MBAIaAP ↓MBAspAP ↑ <i>Ang III</i> ↑ <i>Ang IV</i>	↑MBGluAP ↑MBAIaAP ↑ <i>Ang III</i> ↑ <i>Ang IV</i> ⁴	=	
RENAL CORTEX	↓AP	=AP ¹	↓AP		↓Sol AP		↑MBAIaAP ↑MBAspAP ↑ <i>Ang 2-10</i>	
RENAL MEDULLA	↓AP	↓AP ¹	↓MBAspAP		↓SolCysAP ↓MBAspAP ↑ <i>AVP</i>		↑MBAIaAP ↓MBGluAP ↓MBAspAP ↑ <i>Ang II</i>	

Table 6. Soluble (Sol) or membrane-bound (MB) aminopeptidase activities in SHR after oral administration of captopril (CA), propranolol (P) and L-NAME (LN) during four weeks, and after fed a diet enriched with virgin olive oil (VOO) during twelve weeks in the different tissues analyzed. Proposed active Ang metabolites after treatments are indicated in italics. Information of previous results obtained from WKY rats is indicated when available.

¹Villarejo et al., 2012; ²Unpublished; ³Ramírez et al., 2009; ⁴Segarra et al., 2010.

6. CONCLUSIONS

1. Spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with captopril (100 mg/kg/day), administered daily in drinking water chronically for 4 weeks, in comparison with control SHR, demonstrated, at the end of the experimental period, lower levels of SBP, weight of total heart and left ventricle and an increase in urine volume. At the end of the experimental period, no differences between groups were observed for body weight, food intake, water intake, weight of left kidney, levels of nitric oxide, glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and triglycerides in plasma, and 8-isoprostanes in urine.
2. The analysis of AlaAP, CysAP, GluAP and AspAP activities after captopril treatment demonstrated, at the end of the experimental period, no differences between groups in plasma aminopeptidase activities. In hypothalamus, there was a reduction in the activity of membrane-bound AlaAP, but no differences were observed for the rest of soluble or membrane-bound activities. This may suggest increased availability of Ang III and Ang IV. In renal cortex and medulla, there was a generalized reduction in the different enzymatic activities analyzed.
3. Spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with propranolol (100 mg/kg/day), administered daily in drinking water chronically for 4 weeks, in comparison with control SHR demonstrated, at the end of the experimental period, a reduction in body weight, food intake, water intake and 8-isoprostanes in urine, and an increase of triglycerides in plasma. At the end of the experimental period, no differences between groups were observed for SBP, weight of total heart, left ventricle and left kidney, levels of diuresis and levels of nitric oxide, glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, and LDL-cholesterol in plasma.
4. The analysis of AlaAP, CysAP, GluAP and AspAP activities after propranolol treatment demonstrated, at the end of the experimental period, increased levels of GluAP and AspAP activities in plasma, without differences in AlaAP and CysAP activities which may suggest increased formation of Ang III and Ang 2-10. In hypothalamus, there was a reduction in membrane-bound AlaAP and AspAP activities, but no differences were observed for the rest of soluble or membrane-bound activities suggesting higher availability of Ang III and Ang IV. In renal cortex, except for soluble GluAP and AspAP activities, that did not change, the rest of soluble and membrane-bound activities decreased after propranolol treatment. In renal medulla, membrane-bound AspAP activity

decreased, but the rest of soluble or membrane bound activities did not change.

5. Spontaneously hypertensive rats (SHR), treated with L-NAME (70 mg/kg/day), administered daily in drinking water chronically for 4 weeks, in comparison with control SHR demonstrated, at the end of the experimental period, an increase of SBP, weight of total heart, left ventricle and left kidney, level of diuresis and triglycerides in plasma and 8-isoprostanes in urine; and a decrease of nitric oxide in plasma. However, no differences were observed for body weight, food and water intake, levels of glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in plasma.
6. The analysis of AlaAP, CysAP, GluAP and AspAP activities after L-NAME treatment, demonstrated at the end of the experimental period, no differences in plasma aminopeptidase activities. In hypothalamus, while there was a reduction in membrane-bound AlaAP and AspAP activities, no differences were observed for the rest of soluble or membrane-bound activities, suggesting higher availability of Ang III and Ang IV. In renal cortex, whereas there was a general reduction of soluble aminopeptidase activities, no differences were observed for membrane-bound ones. In renal medulla, soluble CysAP and membrane-bound AspAP decreased after L-NAME treatment, but no differences were observed for the rest of activities. This results suggested higher availability of AVP in these conditions.
7. Spontaneously hypertensive rats fed a standard diet (S) or a diet enriched in virgin olive oil (VOO) during 12 weeks demonstrated a progressive increase in SBP until the end of the feeding period. However, this increase was delayed in the VOO group until the week 6 and SBP was always lower in the VOO group than in the S one. Body weight increased progressively until the end of the feeding period, without differences between both groups. There was no clear pattern for food intake during the feeding period, being their mean values similar for both groups. Except for the three first weeks, during the most part of the feeding period, there were no remarkable differences between groups in water intake. However, urine volume was mostly lower in the VOO than in the S group. In the middle of the feeding period, urine levels of nitric oxide were lower in VOO than in S group with no differences at the beginning and at the end of the feeding period.
8. Spontaneously hypertensive rats fed a diet enriched in virgin olive oil during 12 weeks demonstrated at the end of the feeding period, higher levels of glucose, total cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol in plasma than in a group fed with a Standard diet. Lower weight of left kidney and lower levels of 8-isoprostanes in urine were observed in the VOO group. No differences between groups were demonstrated for

weigh of total heart and left ventricle, nitric oxide and HDL-cholesterol in plasma. Glucose tolerance test demonstrated a delay in recovering basal levels of glucose in the VOO group compared with the standard.

9. The analysis of AlaAP, CysAP, GluAP and AspAP activities after the feeding period demonstrated, no differences between groups in the aminopeptidase activities assayed from plasma, hypothalamus, or the soluble activities determined in renal cortex and medulla. However, membrane-bound AlaAP and AspAP activities increased in renal cortex of the VOO group suggesting higher formation of Ang 2-10. In renal medulla, while membrane-bound AlaAP also increased membrane-bound GluAP and AspAP activities decreased in the VOO group which suggests higher availability of Ang II.

7. Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science and Innovation through project no. SAF 2008 04685 C02 01.

8. REFERENCES

- Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, Mendelsohn FA, Simpson RJ, Connolly LM, Chai SY.* Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001; 276: 48623-48626.
- Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Duran R, Luna J de D, Segarra AB, Hermoso F, Ramírez M.* Asymmetrical response of aminopeptidase A and nitric oxide in plasma of normotensive and hypertensive rats with experimental hemiparkinsonism. *Neuropharmacology* 2009; 56: 573-579.
- Bankir L.* Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects. *Cardiovasc Res* 2001; 51: 372-390.
- Barret AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds) (1998)* Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, London
- Bodineau L, Frugière A, Marc Y, Inguibert N, Fassot C, Balavoine F, Roques B, Llorens-Cortes C.* Orally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure: a new strategy for treating hypertension. *Hypertension*. 2008; 51: 1318-1325.
- Bonjour JP, Malvin RL.* Stimulation of ADH release by the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1970; 218: 1555-1559.
- Burns KD, Li N.* The role of angiotensin II-stimulated renal tubular transport in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5:165-171.
- Chen Q, Turban S, Miller ER, Appel LJ.* The effects of dietary patterns on plasma renin activity: results from the Dietary Approaches to Stop Hypertension trial. *J Hum Hypertens.* 2012;26:664-669.
- Cogolludo, A.; Pérez-Vizcaino, F.; Tamargo, J.* New Insights in the pharmacological therapy of arterial hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2005, 14, 423-427.
- Danziger RS.* Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev.* 2008;13:293-298.
- Darga LL, Hakim MJ, Lucas CP, Franklin BA.* Comparison of the effects of guanadrel sulfate and propranolol on blood pressure, functional capacity, serum lipoproteins and glucose in systemic hypertension. *Am J Cardiol.* 1991;67:590-596.

deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 29: 340-349.

de Gasparo M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev.* 2002;7:347-358.

Elased KM, Cunha TS, Marcondes FK, Morris M. Brain angiotensin-converting enzymes: role of angiotensin-converting enzyme 2 in processing angiotensin II in mice. *Exp Physiol* 2008; 93: 665-675.

Engler MM, Schambelan M, Engler MB, Ball DL, Goodfriend TL. Effects of dietary gamma-linolenic acid on blood pressure and adrenal angiotensin receptors in hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;218:234-237.

Ferdinand KC. Update in pharmacologic treatment of hypertension. *Cardiol Clin.* 2001;19:279-294.

Ferrario CM. ACE2: more of Ang-(1-7) or less Ang II? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20: 1-6.

Grima M, Ingert C, Michel B, Barthelmebs M, Imbs JL. Renal tissue angiotensins during converting enzyme inhibition in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens.* 1997;19 : 671-685.

Hoefel AL, Hansen F, Rosa PD, Assis AM, Silveira SL, Denardin CC, Pettenuzzo L, Augusti PR, Somacal S, Emanuelli T, Perry ML, Wannmacher CM. The effects of hypercaloric diets on glucose homeostasis in the rat: influence of saturated and monounsaturated dietary lipids. *Cell Biochem Funct.* 2011; 29: 569-576.

Hu WY, Chen DG, Chen SC, Jin XQ, Wang HJ. Effect of chronic captopril treatment on circulating and tissue renin-angiotensin system in SHR rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1996; 17: 507-512.

Keil LC, Summy-Long J, Severs WB. Release of vasopressin by angiotensin II. *Endocrinology* 1975; 96: 1063-1065.

Kline RL, Mercer PF. Effect of captopril and hydralazine on arterial pressure-urinary output relationships in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1987;10:590-594.

Kramer JH, Spurney CF, Iantorno M, Tziros C, Chmielinska JJ, Mak IT, Weglicki WB. d-Propranolol protects against oxidative stress and progressive cardiac dysfunction in iron overloaded rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90:1257-1268.

Liu Y, Tsuchihashi T, Kagiya S, Matsumura K, Abe I, Fujishima M. Central and peripheral mechanisms involved in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Hypertens.* 1998;16:1165-1173.

Navarro J, Sanchez A, Sáiz J, Ruilope LM, García-Estañ J, Romero JC, Moncada S, Lahera V. Hormonal, renal, and metabolic alterations during hipertensión induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol.* 1994;267:R1516-1521.

Orange SJ, Ledingham JM, Lavery R. Cardiovascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition in genetically hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:488-493.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86: 747-803.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic press, 1998.

Prieto I, Arechaga G, Segarra AB, Alba F, de Gasparo M, Ramirez M. Effects of dehydration on renal aminopeptidase activities in adult male and female rats. *Regul Pept.* 2002;106:27-32.

Prieto I, Segarra AB, Vargas F, Alba F, de Gasparo M, Ramirez M. Angiotensinase activity in hypothalamus and pituitary of hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid adult male rats *Horm Metab Res* 2003; 35: 279-281.

Priviero FB, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Zanesco A, Antunes E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. *Eur J Pharmacol.* 2007;571:189-196

Raj L. Workshop: hypertension and cardiovascular risk factors: role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. *Hypertension.* 2001;37:767-773.

Ramírez M, Prieto I, Alba F, Vives F, Banegas I, de Gasparo M. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Fail Rev* 2008; 13: 339-353.

Ramírez M, Segarra AB, Banegas I, Prieto I. Angiotensinase Activity and Blood Pressure Control in Hypothalamus after Sympathetic β Receptor Blockade. XIII meeting of the Spanish Society of Neuroscience. Tarragona, September 16-19, 2009.

Ramírez M, Segarra AB, Villarejo AB, Banegas I, Wangensteen R, Vives F, Prieto I. Angiotensinase Activity in Hypothalamus and Plasma of Hypertensive rats after Sympathetic β -Receptor Blockade. 8th IBRO CONGRESS, 14-18 July, 2011, Florence, Italy.

Ramírez M, Prieto I, Banegas I, Segarra AB, Alba F. Neuropeptidases. *Methods Mol Biol.* 2011;789:287-94.

Ramírez-Sánchez M, Prieto I, Wangensteen R, Banegas I, Segarra AB, Villarejo AB, Vives F, Cobo J, de Gasparo M. The Renin-Angiotensin System: New Insight into Old Therapies. *Curr Med Chem.* 2013 Jan 21. [Epub ahead of print]

Reams, G; Bauer, J. Pharmacologic Treatment of Hypertensión, cap. 7 en vol. 3 (editor C. S. Wilcox) del "Atlas of Diseases of the Kidney", R. W. Schrier series editor; Blackwell Science, 1999.

Robinson MM, McLennan GP, Thunhorst RL, Johnson AK. Interactions of the systemic and brain renin-angiotensin systems in the control of drinking and the central mediation of pressor responses. *Brain Res* 1999; 842: 55-61.

Schiavone MT, Khosla MC, Ferrario CM. Angiotensin-[1-7]: evidence for novel actions in the brain. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 Suppl 4: S19-24.

Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario CM. Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3: 125-137.

Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, Hermoso F, Vargas F, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Prieto I. Influence of thyroid disorders on kidney angiotensinase activity. *Horm Metab Res* 2006; 38: 48-52.

Segarra AB, Ramirez M, Banegas I, Alba F, Vives F, Gasparo Md, Ortega E, Ruiz E, Prieto I. Dietary fat influences testosterone, cholesterol, aminopeptidase A, and blood pressure in male rats. *Horm Metab Res.* 2008;40:289-291.

Segarra AB, Ramírez M, Villarejo AB, Banegas I, Vives F, de Gasparo M, Alba F, Cobo J, Prieto I. Hypothalamic and plasmatic angiotensin metabolism in L-NAME treated rats. *Horm Metab Res.* 2010;42:222-224.

Segarra AB, Prieto I, Villarejo AB, Banegas I, Wangensteen R, de Gasparo M, Vives F, Ramírez-Sánchez M. Effects of Antihypertensive Drugs on Angiotensinase Activities in the Testis of Spontaneously Hypertensive Rats. *Horm Metab Res.* 2012 Dec 7. [Epub ahead of print].

Segarra AB, Prieto I, Banegas I, Villarejo AB, Wangensteen R, de Gasparo M, Vives F, Ramírez-Sánchez M. The Brain-Heart Connection: Frontal Cortex and Left Ventricle Angiotensinase Activities in Control and Captopril-Treated Hypertensive Rats—A Bilateral Study, *Int J Hypertens*, vol. 2013, Article ID 156179, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/156179.

Speth RC, Karamyan VT. The significance of brain aminopeptidases in the regulation of the actions of angiotensin peptides in the brain. *Heart Fail Rev* 2008; 13: 299-309.

Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, Teräväinen TL, Laakso J, Karppanen H, Vapaatalo H. Cardiovascular effects of chronic inhibition of nitric oxide synthesis and dietary salt in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 1997;20:183-192.

Vauquelin G, Michotte Y, Smolders I, Sarre S, Ebinger G, Dupont A, Vanderheyden P. Cellular targets for angiotensin II fragments: pharmacological and molecular evidence. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 3: 195-204.

Velez JC, Ryan KJ, Harbeson CE, Bland AM, Budisavljevic MN, Arthur JM, Fitzgibbon WR, Raymond JR, Janech MG. Angiotensin I is largely converted to angiotensin (1-7) and angiotensin (2-10) by isolated rat glomeruli. *Hypertension.* 2009;53:790-797.

Vilas-Boas, W.W.; Ribeiro-Oliveira, A. Jr.; Ribeiro Rda, C.; Vieira, R.L.; Almeida, J.; Nadu, A.P.; Simões e Silva, A.C.; Santos, R.A. Effect of propranolol on the splanchnic and peripheral renin angiotensin system in cirrhotic patients. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14: 6824-6830.

Villarejo AB, Segarra AB, Ramírez M, Banegas I, Wangensteen R, de Gasparo M, Cobo J, Alba F, Vives F, Prieto I. Angiotensinase and vasopressinase activities in hypothalamus, plasma, and kidney after inhibition of angiotensin-converting enzyme: basis for a new working hypothesis. *Horm Metab Res.* 2012;44:152-154.

Vives F, Segarra AB, Villarejo AB, Banegas I, Wangensteen R, Ramírez M, Hermoso F, Prieto I. Hypothalamic and Plasmatic Angiotensin Metabolism in L-NAME Treated Hypertensive Rats. 8th IBRO CONGRESS, 14-18 July, 2011, Florence, Italy.

Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E1092-1102.

Weiss L, Lundgren Y. Left ventricular hypertrophy and its reversibility in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 1978;12:635-638.

Xu Z, Johnson AK. Central renin injections: effects on drinking and expresión of immediate early genes. *Brain Res* 1998 ; 782: 24-35.

Zhenfeng, Zheng.; Huilan, Shi.; Junya, Jia.; Dong, Li.; Shan, Lin. A systematic review and meta-analysis of aliskiren and angiotension receptor blockers in the management of essential hypertension. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12: 102-112.

Yang XD, Zhao LY, Zheng QS, Li X. Effects of arginine vasopressin on growth of rat cardiac fibroblasts: role of V1 receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003; 42: 132-135.

Yu W, Akishita M, Xi H, Nagai K, Sudoh N, Hasegawa H, Kozaki K, Toba K. Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. *Clin Chim Acta.* 2006;364:328-334.

Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11968-11973.

Zucker IH, Liu JL. Angiotensin II--nitric oxide interactions in the control of sympathetic outflow in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2000; 5: 27-43.

