

Alteraciones vasculares en ratones obesos por dieta rica en grasa: papel de la vía L-arginina/NO endotelial

Thiago Bruder Nascimento¹, Rafaela de Fátima Ferreira Baptista¹, Priscila Cristina Pereira¹, Dijon Henrique Salomé Campos², André Soares Leopoldo¹, Ana Paula Lima Leopoldo², Silvio A. Oliveira Júnior², Carlos Roberto Padovani³, Antônio Carlos Cicogna², Sandra Cordellini¹

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências - UNESP¹; Departamento de Medicina Clínica - UNESP²; Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências - UNESP - Universidade Estadual Paulista³, São Paulo, SP - Brasil

Resumen

Fundamento: Los mecanismos subyacentes a las anomalías vasculares en la obesidad todavía no están completamente aclarados.

Objetivo: Se evaluó la vía del óxido nítrico/L-arginina en la respuesta vascular de ratones obesos por dieta rica en grasa, concentrándonos en las células endoteliales y en el músculo liso.

Métodos: Ratones con 30 días de vida que fueron divididos en 2 grupos: control (C) y obeso (OB, ratones bajo dieta rica en grasa durante 30 semanas). Después de 30 semanas, fueron registrados el peso corporal, el índice de adiposidad, la presión arterial y los perfiles metabólicos y endocrinos de los animales. Fueron obtenidas las curvas para noradrenalina en ausencia y en presencia del inhibidor de óxido nítrico sintasa (L-NAME, $3 \times 10^{-4} M$), en la aorta torácica intacta y con denudación de los ratones C y OB.

Resultados: Las medidas de peso corporal, índice de adiposidad, leptina e insulina aumentaron en los ratones OB, mientras que la presión arterial permaneció inalterada. La obesidad también produjo una tolerancia a la glucosa y una resistencia a la insulina. La reactividad a la noradrenalina de la aorta intacta fue similar en los ratones C y OB. La presencia de L-NAME generó un aumento similar en las respuestas máximas, pero una desviación mayor a la izquierda de las respuestas en las aortas intactas de los ratones C con relación a los ratones OB [EC50 ($\times 10^{-7} M$): C = 1,84 (0,83-4,07), O = 2,49 (1,41-4,38); presencia de L-NAME C = 0,02 (0,01-0,04)*, O = 0,21 (0,11-0,40)*†, *p < 0,05 vs control respectivo, †p < 0,05 vs control más L-NAME, n = 6-7]. Ninguno de los protocolos alteró la reactividad a la noradrenalina de las aortas con denudación.

Conclusión: La obesidad inducida por dieta rica en grasa genera alteraciones metabólicas y vasculares. La alteración vascular conllevó a una mejoría de la vía endotelial L-arginina/NO tal vez relacionada con la hiperinsulinemia e hiperleptinemia inducidas por dieta. La mayor resistencia a los efectos del L-NAME en la aorta de ratones obesos, se refiere a una menor vulnerabilidad de individuos obesos en presencia de patologías asociadas que causan daños a la actividad del sistema NO. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(1):40-45)

Palabras clave: Obesidad, ratones, grasas en la dieta, óxido nítrico, endotelio vascular.

Introducción

La obesidad puede ser definida como una enfermedad en la cual el exceso acumulado de grasa corporal es tal que la salud puede verse muy afectada. Se le considera una epidemia global, y constituye uno de los principales problemas de salud pública^{1,2}. Aunque la etiología de la obesidad sea compleja, diversos factores están vinculados a su desarrollo, especialmente la ingestión hipercalórica³. En ese sentido, existen diversos modelos experimentales de obesidad, pero

la obesidad inducida por dieta es el modelo experimental más relevante con relación a la obesidad humana⁴.

Las investigaciones recientes han venido demostrando que la obesidad reduce la expectativa de vida y que está asociada a complicaciones médicas, como la diabetes mellitus tipo 2, el aumento en la incidencia de ciertos tipos de cáncer, complicaciones respiratorias (apnea obstructiva del sueño), dislipidemia, hipertensión, arterosclerosis y alteraciones vasculares^{1,5}. Las actuales directrices respaldan con firmeza la pérdida de peso en pacientes con sobrepeso u obesos. Esa iniciativa, sin embargo, no hace distinción entre los individuos sanos y los que tienen enfermedades crónicas, como la insuficiencia cardíaca y la enfermedad arterial coronaria arterosclerótica. Hacer la distinción entre esas poblaciones puede ser importante porque existen evidencias que demuestran que entre los pacientes con enfermedades

Correspondencia: Sandra Cordellini •

Rua João Carmelo, 145 - Jardim Paraíso - 18610-290 - Botucatu, SP - Brasil
E-mail: cordelli@ibb.unesp.br, bruderthiago@yahoo.com.br
Artículo recibido el 22/11/10; revisado recibido el 14/01/11; aceptado el 26/01/11.

crónicas, el exceso de peso está paradójicamente asociado a una reducción en el riesgo de los desenlaces adversos⁶⁻⁸.

Diversos estudios han mostrado que los cambios en la producción y/o liberación de óxido nítrico (NO), uno de los principales factores endoteliales que está involucrado en la regulación del tono muscular^{9,10}, están involucrados en varias respuestas patofisiológicas. Aunque existan algunas controversias con relación a la involucración de la vía del NO en disturbios vasculares inducidos por la obesidad, hay pruebas de que el empeoramiento en la síntesis de NO representa una alteración importante en el desarrollo de muchas de las anomalías vasculares características de los estados de obesidad^{11,12}.

Por tanto, el objetivo del presente estudio, fue evaluar el impacto de la obesidad inducida por dietas ricas en grasa en la modulación de la vía del NO en el tono arterial, concentrándonos en las células endoteliales y musculares lisas. Este estudio aumenta la comprensión de los mecanismos de las alteraciones vasculares inducidas por la obesidad.

Métodos

Animales

Ratones machos Wistar con treinta días de vida (~150 g), que fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: control (C) y obeso (Ob). Al grupo control se le alimentó con pienso estándar para ratones que contenía un 4% de grasa, un 42,7% de carbohidratos y 22% de proteínas; mientras que los animales obesos recibieron una dieta rica en grasa conteniendo un 20% de grasa, 26,4% de carbohidratos y 20% de proteínas. Cada grupo fue alimentado con esas dietas por 30 semanas (C y Ob; n = 22). La dieta rica en grasa fue elaborada en nuestro laboratorio con un Pienso Animal en polvo Agroceres[®] (Rio Claro, SP, Brasil), alimento industrializado, suplemento de proteína, vitaminas y minerales. La dieta rica en grasa era rica en calorías (dieta rica en grasa = 3,65 kcal/g versus dieta estándar = 2,95 kcal/g), debido a una mayor composición de grasa, hecha con ácidos grasos saturados (20%) y no saturados (80%). Todos los ratones se pusieron en jaulas individuales en ambientes climatizados y con una temperatura de aire en 23 ± 3° C, con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y 60 ± 5% de humedad relativa.

Todos los experimentos y procedimientos se ejecutaron respetando el *Manual sobre Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio*, publicado por el U.S. National Institutes of Health¹³, y fueron aprobados por el Comité de Ética de la Escuela de Medicina de Botucatu (UNESP, Botucatu, SP, Brasil).

Perfil nutricional, metabólico y endocrino de los animales

Para analizar si la obesidad inducida por dieta rica en grasa estaba asociada a las alteraciones en el comportamiento nutricional, el consumo de alimento fue medido diariamente. La ingestión de calorías por semana se calculó a través del promedio del consumo semanal de alimento x la densidad energética dietética.

Como la obesidad está definida como una cantidad excesiva de grasa corporal con relación a la masa corporal libre

de grasa¹⁴, un indicador de adiposidad fue considerado a partir de la suma de diversas capas adiposas. Después de 12-15 h de ayuno, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y sufrieron eutanasia por decapitación. Los animales fueron toracotomizados y la grasa corporal (GC), total fue medida por la suma de los pesos individuales de las capas adiposas, a saber: visceral, epididimal y retroperitoneal. El índice de adiposidad fue calculado por la razón: (grasa corporal total/peso corporal final) x 100.

La obesidad puede venir acompañada de disturbios metabólicos y endocrinos¹, por tanto, se analizaron la tolerancia glucémica, la leptinemia y la insulinemia. Con relación a la tolerancia glucémica, después del ayuno de 12-15 h, los ratones se sometieron al test de tolerancia a la glucosa (TTG). Muestras de sangre se obtuvieron del rabo para medidas basales y después de la administración de la glucosa (2 g/kg, i.p.)^{15,16}. Se recolectaron también muestras de sangre en los tiempos 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Los niveles de glucosa fueron determinados usando el analizador ACCU-CHECK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda., Brazil). La tolerancia a la glucosa se analizó a partir del área bajo la curva de respuestas glucémicas. Para el análisis bioquímico y hormonal, se recolectó sangre del tronco arterial en tubos heparinizados, centrifugados a 3000 g por 15 min a 4° C. Las concentraciones de leptina sérica e insulina fueron determinadas por ELISA, utilizando kits comerciales (Linco Research Inc., EUA).

Modelo de evaluación de la homeostasis (HOMA)

HOMA, es un índice de resistencia a la insulina que utiliza medidas en ayunas de concentraciones de glucosa e insulina en plasma. Fue calculado de acuerdo con el método descrito anteriormente¹⁷.

Medida de presión arterial sistólica

La presión arterial sistólica se determinó semanalmente usando el método de la pletismografía de cola (Narco Bio-Systems, Inc., Houston, TX), en ratones conscientes. Los ratones se precalentaron a 35 ± 2° C por 5 minutos y fueron puestos en un aparato de contención para la medida de la presión arterial. Se registró el promedio de tres medidas consecutivas estables (con una diferencia de ~1 min). La presión del manguito fue controlada automáticamente y los pulsos sistólicos detectados por el transductor de pulso fueron monitorizados con la señal de audio. Se tomaron precauciones en la selección de un tamaño de manguito apropiado para los animales.

Reactividad vascular

Después de 30 semanas de dieta rica en grasa o pienso estándar para ratones, los animales se decapitaron. La aorta torácica descendente fue retirada y liberada de la grasa adherente y del tejido conectivo. Dos anillos transversos de la misma arteria, cada uno con cerca de 4 mm de largura, se cortaron y se colocaron en el tamaño adecuado para el registro de la tensión isométrica en cámaras de órgano aislado. Un anillo se usó como control, mientras que el endotelio fue mecánicamente retirado del otro raspándose suavemente la superficie luminal¹⁸. Las preparaciones se montaron en cámaras que contenían 7 ml de solución de Krebs-Henseleit,

Artículo Original

con una composición en mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 25,0; Glucosa 11,0; y ácido ascórbico al 0,11. El fluido del baño se mantuvo a 37,0 ± 0,5° C, y fue saturado con la mezcla gaseosa de un 95% de O₂ y un 5% CO₂. Las preparaciones se dejaron hasta que alcanzasen el equilibrio de por lo menos 1 h bajo una tensión de reposo de 1,5 g, la cual es excelente en la inducción de la contracción máxima. Variaciones de tensión se registraron por un fisiógrafo (Ugo Basile).

Las curvas de concentración-efecto acumulativas se construyeron a partir de la respuesta del tejido a la noradrenalina, en ausencia y presencia de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME 3 × 10⁻⁴ M, inhibidor de NO sintasa - NOS) (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, EUA). Al final de las curvas, dosis únicas de acetilcolina (10⁻⁶ M) y nitroprusiato de sodio (10⁻⁴ M), se usaron para testar la integridad de las capas endoteliales y del músculo liso, respectivamente.

Análisis estadístico

La presión arterial, el índice HOMA y los perfiles nutricional, metabólico y endocrino, fueron expresados como promedios ± desviaciones estándar. Las comparaciones entre los grupos fueron hechas usando el test *t* de Student para muestras independientes. El promedio semanal del peso corporal y el perfil glucémico de los grupos fueron comparados por ANOVA para medidas repetidas y por el test de Bonferroni (*post hoc test*).

La concentración de agentes vasoactivos que producían una respuesta que era 50% del máximo (EC50) y las respuestas máximas, se calcularon en cada experimento. Los valores de EC50, presentados como promedio con intervalos de confianza de un 95% y las respuestas máximas (g de tensión), presentadas como promedios ± EPM, fueron comparados por ANOVA y el test *post hoc* de Tukey.

El nivel de significancia considerado fue de un 5%.

Resultados

La Tabla 1 muestra los perfiles nutricional, metabólico y endocrino de los ratones. Los ratones obesos ingirieron menos comida que los ratones control, pero sin embargo, la ingestión de calorías, el índice de masa corporal y el peso corporal final al completar las 30 semanas, superaron, en los obesos, a los del grupo control. Además, la presión arterial no fue diferente entre el grupo control y el obeso (Tabla 1). La tolerancia a la glucosa fue menor en los ratones obesos (Figura 1).

Tabla 1 - Efecto de la obesidad inducida por dieta rica en grasas en las características generales de los ratones

Características	Control	Obeso
PCF (g)	498 ± 26	562 ± 36*
IA (g)	25,1 ± 1,7	21,8 ± 1,8*
IC (g kcal/día)	74,3 ± 5,4	86,1 ± 6,2*
GE (g)	6,65 ± 1,96	9,21 ± 3,80*
GR (g)	7,86 ± 2,35	11,58 ± 4,90*
GV (g)	8,31 ± 3,37	11,43 ± 4,58*
IA (%)	4,28 ± 1,65	5,96 ± 1,54*
PAF (mmHg)	130,7 ± 5,7	134,6 ± 6,9

Ratones Control (n = 6) que recibieron una dieta estándar (4% grasa, 42,7% carbohidratos y 22% proteína), y ratones obesos (n=7) que recibieron una dieta rica en grasas (20% grasa, 26,4% carbohidratos y 20% proteína) durante 30 semanas. PCF - peso corporal final; IA - ingestión de alimento; IC - ingestión calórica; GE - grasa epididimal; GR - grasa retroperitoneal; GV - grasa visceral; IA - índice de adiposidad; PAF - presión arterial final. Valores expresados en promedio ± DP. *p < 0,05 vs control (test t de Student para muestras independientes).

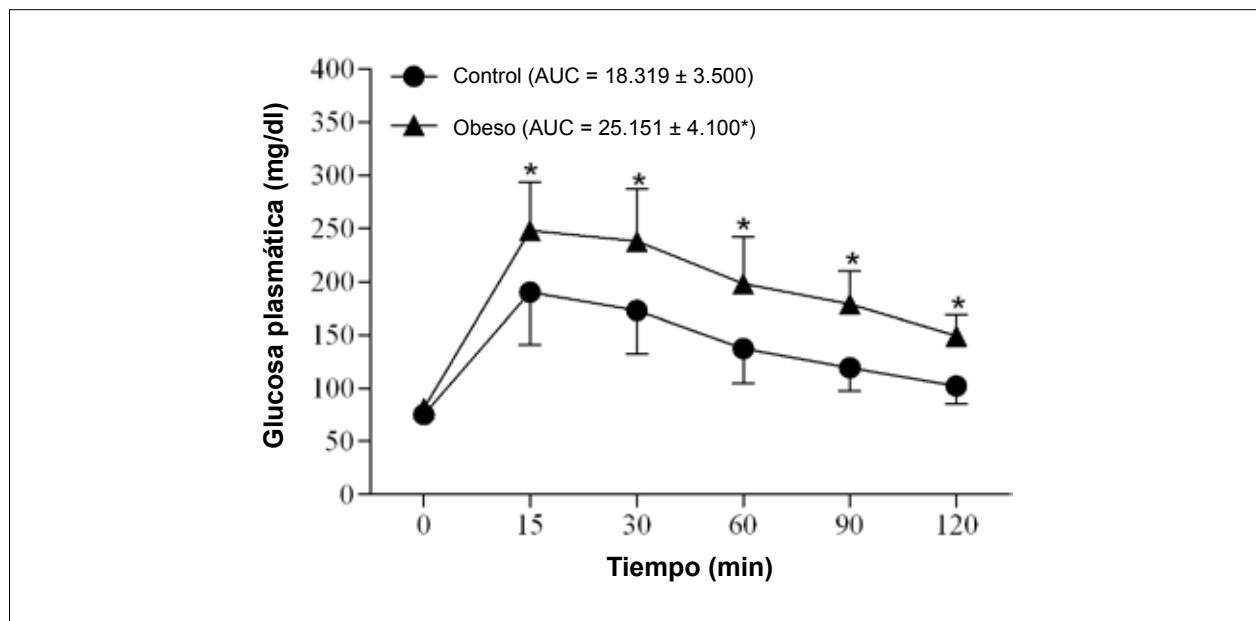


Fig. 1 - Test de Tolerancia a la Glucosa en ratones control que reciben una dieta estándar: 4% grasa, 42,7% carbohidratos y 22% proteína durante 30 semanas (n = 22), y ratones obesos, sometidos a 30 semanas de dieta con un alto contenido de grasa: 20% grasa, 26,4% carbohidratos y 20% proteína (n = 22). Valores expresados en promedios ± desviación estándar. AUC - área bajo la curva para glucosa. *p < 0,05 control vs obeso; ANOVA para medidas repetidas y test *post hoc* de Bonferroni.

La leptina plasmática $C = 2,2 \pm 1,9$; $Ob = 7,8 \pm 3,3^*$ ng/dl, $n = 6-7$), los niveles de glucosa ($C = 107,0 \pm 22,1$; $Ob = 126,0 \pm 19,3^*$ mg/dl, $n = 6-7$), los niveles de insulina ($C = 0,23 \pm 0,08$; $Ob = 0,54 \pm 0,07^*$ ng/dl, $n = 6-7$) y el índice HOMA ($C = 18.319 \pm 3.500$; $Ob = 25.151 \pm 4.100^*$, $n = 6-7$), fueron significativamente mayores en los obesos en comparación con el grupo control ($* p < 0,05$).

En ausencia del L-NAME, quedó demostrado que la reactividad a la noradrenalina de la aorta intacta era similar en los ratones con dieta rica en grasa y en los ratones con dieta estándar (Figura 2 y Tabla 2). La retirada del endotelio causó una desviación hacia la izquierda de las curvas de la noradrenalina en la aorta, que fue similar en los grupos control y de ratones obesos (Figura 2 y Tabla 2). Ese procedimiento también determinó un aumento similar en la respuesta máxima a la noradrenalina de aortas de los ratones control y obesos (Figura 2 y Tabla 2).

La presencia del L-NAME generó una desviación hacia la izquierda en las curvas de la noradrenalina que fue menor en las aortas intactas de ratones con dieta rica en grasa que en los ratones control (Figura 2 y Tabla 2). Ese inhibidor también produjo un aumento de la respuesta máxima de la aorta a la noradrenalina que fue similar entre los grupos control y obesos (Figura 2 y Tabla 2).

Independientemente de la presencia del L-NAME, la reactividad a la noradrenalina no fue diferente entre las aortas sin el endotelio (Figura 2 y Tabla 2).

Discusión

En este estudio, los ratones con una dieta rica en grasa, desarrollaron una obesidad caracterizada por el aumento en el peso corporal final y en la masa de tejido adiposo. Aunque el grupo obeso haya ingerido menos comida, la mayor ganancia

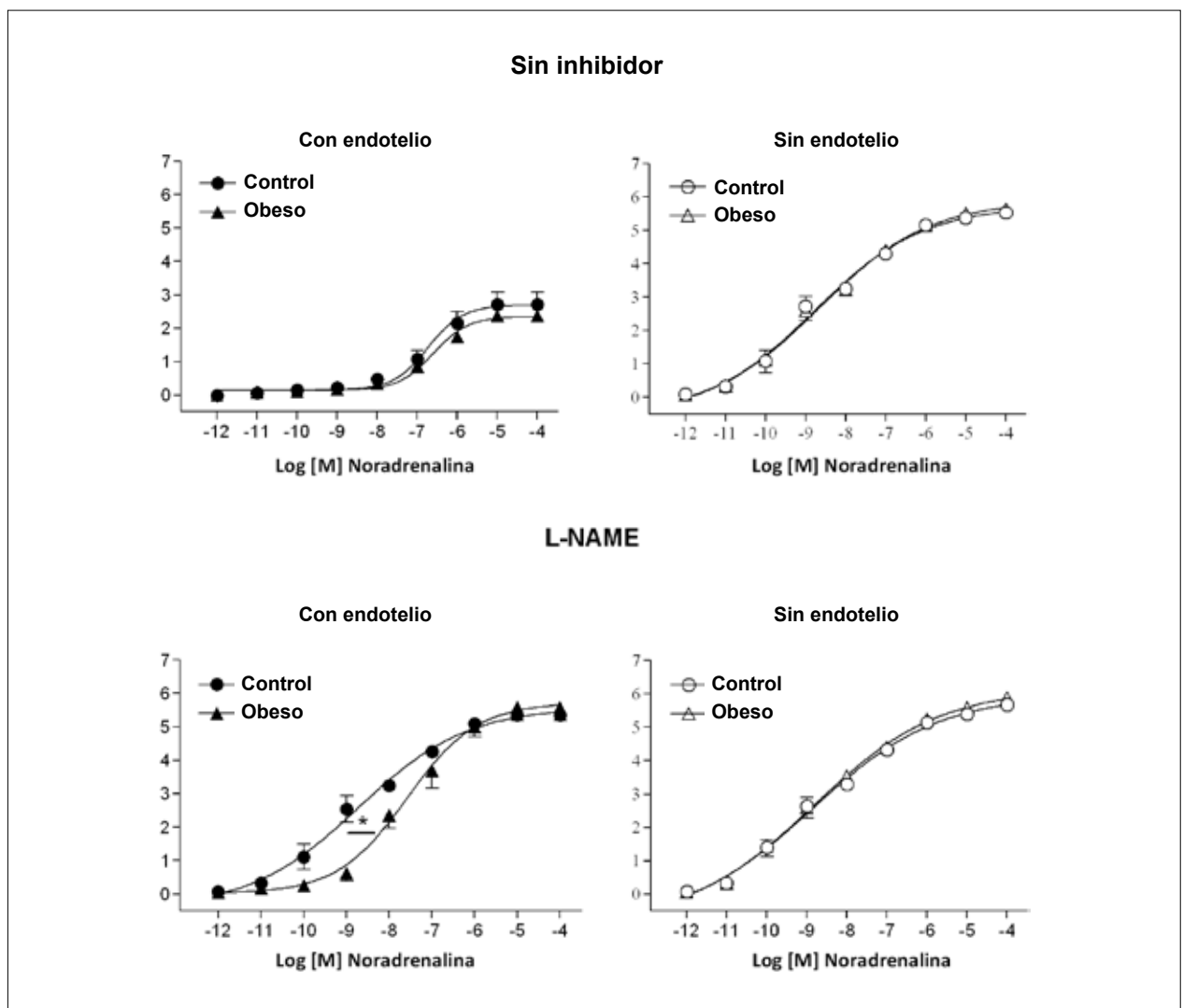


Fig. 2 - Curvas concentración-efecto a la noradrenalina, en ausencia y presencia de L-NAME (3×10^{-4} M), obtenidas en dos anillos, uno con (símbolo sólido) y el otro sin (símbolo vacío), endotelio, de la misma aorta torácica de ratones control (recibiendo una dieta estándar: 4% grasa, 42,7% carbohidratos y 22% proteína durante 30 semanas, $n = 6$) y obesos (recibiendo una dieta con un alto contenido de grasa: 20% grasa, 26,4% carbohidratos y 20% proteína durante 30 semanas $n = 7$). $*p < 0,05$; ANOVA y test de Tukey.

Tabla 2 - Respuesta máxima y valores de EC50 a la noradrenalina, obtenidos en dos anillos, uno con el endotelio y el otro sin el endotelio, en presencia y en ausencia de L-NAME (3x10⁻⁴), de la misma aorta torácica de ratones control y obesos

Grupos		Respuesta máxima (g)		EC50	
		Con endotelio	Sin endotelio	Con endotelio (x10 ⁻⁷ M)	Sin endotelio (x10 ⁻⁸ M)
Control (n = 6)	Sin inhibidor	2,69 ± 0,10	5,74 ± 0,40‡	1,84 (0,83-4,07)	0,16‡ (0,06-0,42)
	L-NAME	4,91 ± 0,18*	5,60 ± 0,22	0,02* (0,01-0,04)	0,14 (0,05-0,38)
Obeso (n = 7)	Sin inhibidor	2,35 ± 0,07	5,90 ± 0,38‡	2,49 (1,41-4,38)	0,22‡ (0,08-0,55)
	L-NAME	5,33 ± 0,18*	5,72 ± 0,28	0,21*† (0,11-0,40)	0,15‡ (0,05-0,43)

Ratones Control que recibieron una dieta estándar (4% grasa, 42,7% carbohidratos y 22% proteína), y ratones obesos que recibieron una dieta rica en grasas (20% grasa, 26,4% carbohidratos y 20% proteína) durante 30 semanas. Respuesta máxima y EC50 expresados en promedio ± EPM y promedio, seguido de un intervalo de confianza de un 95% entre paréntesis, respectivamente. *p < 0,05 vs control respectivo; †p < 0,05 vs control/L-NAME; ‡p < 0,05 vs respectiva aorta con endotelio; ANOVA y test de Tukey. n - número de animales.

de peso exhibido por esos animales se dio muy probablemente, debido al aumento de la ingestión de calorías y a la eficiencia de la alimentación con relación a los controles. Además, los ratones obesos sufrieron disturbios metabólicos como la intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, características generalmente relacionadas con la obesidad humana^{15,19,20}. La resistencia a la insulina, definida como la disminución de la sensibilidad y/o respuesta a las acciones metabólicas de la insulina, es una característica fundamental de la diabetes, obesidad y dislipidemia²¹. Es ese contexto, fue mostrado un índice HOMA aumentado en los ratones obesos, indicando el desarrollo de resistencia a la insulina en esos animales, conforme a lo que aparece previamente dicho por Naderalli et al²² en ratones alimentados con dieta específica.

Algunos estudios experimentales relataron desenlaces perjudiciales de dietas altamente calóricas en la reactividad vascular. Por ejemplo, una dieta rica en grasa perjudica el vasorelajamiento endotelio-dependiente^{23,24}. Y eso puede, por lo menos en parte, explicar el aumento del riesgo de enfermedad vascular en individuos y animales obesos. Además, la terapia antioxidante mejora la función endotelial^{25,26}, sugiriendo un estrés oxidativo inducido por una dieta en la vasculatura. En el presente estudio, los ratones con una dieta rica en grasa, tuvieron una alteración vascular significativa, en particular una acentuada mejoría endotelial que fue revelada en presencia del L-NAME. En otras palabras, la obesidad inducida por la dieta, no alteró la reactividad de la aorta a la noradrenalina en ausencia del L-NAME. Sin embargo, la presencia de ese inhibidor generó una desviación hacia la izquierda de las curvas de noradrenalina que fue menor en la aorta de los ratones obesos con relación a los ratones control. Además, la dieta rica en grasa no indujo ningún cambio en la reactividad del músculo liso de la aorta a la noradrenalina. Esa conclusión puede deberse a la observación de que, independientemente de la presencia del L-NAME, la reactividad de las aortas con denudación no fue diferente entre los grupos control y el de los ratones obesos.

Ya que la aorta de ratones obesos fue más resistente a los efectos del L-NAME, podemos pensar hipotéticamente,

que la vía L-arginina/NO endotelial es acentuada en la vasculatura de ratones obesos. Además de eso, ese aumento de la biodisponibilidad de NO en ratones bajo una dieta rica en grasa, puede representar un mecanismo de adaptación para equilibrar el desenlace prejudicial relatado para las dietas calóricas en la reactividad vascular en la obesidad, principalmente el estrés oxidativo^{25,26}. La mejoría de la vía NO endotelial también podría explicar la ausencia de cambios en la presión arterial de los ratones obesos, un parámetro frecuentemente aumentado en la obesidad humana y animal^{27,28}. Esos hallazgos confirman la "paradoja de la obesidad"²⁶ y pueden ayudar a la comprensión de los mecanismos responsables de esa condición.

Como colofón, la literatura también relata que la vasodilatación, que conlleva a un aumento en el flujo sanguíneo, es la principal consecuencia fisiológica de la producción de NO estimulada por la insulina en el endotelio vascular²⁹. La hormona leptina también es capaz de activar directamente la producción de NO en vasos y esa activación depende de la integridad endotelial³⁰. Por tanto, la hiperinsulinemia e hiperleptinemia observadas en animales alimentados con una dieta rica en grasa, pueden ser parcialmente responsables por el aumento de la producción y/o liberación de NO endotelial en la vasculatura de ratones obesos.

De manera general, este estudio indica que la obesidad inducida por una dieta rica en grasa genera alteraciones metabólicas y vasculares. La alteración vascular estuvo caracterizada por una mejoría en la vía L-arginina/NO endotelial, probablemente relacionada con las hiperinsulinemia e hiperleptinemia inducidas por la dieta. Finalmente, la mayor resistencia a los efectos del L-NAME en la aorta de los ratones obesos con relación a los ratones control, genera algunas consideraciones sobre la menor vulnerabilidad cardiovascular de individuos obesos en presencia de patologías asociadas, que perjudican la actividad del sistema NO.

Agradecimientos

Agradecemos a la FAPESP, proceso 07/57495-0 y 07/59747-7, por el apoyo financiero ofrecido.

Potencial Conflicto de Intereses

Declaro no haber conflicto de intereses pertinentes.

Fuentes de Financiación

FAPESP financió el presente estudio.

Vinculación Académica

Este artículo forma parte de Disertación de Maestría de Dijon Henrique Salomé Campos, por la Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp.

Referencias

- Kopelman P.G. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.
- O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg*. 2002;184(6B):45-8S.
- Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2522-5.
- Tschöp M, Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109(6):307-19.
- Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006;99(9):565-79.
- Lüscher TF, Tanner FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens*. 1993;6(7 Pt 2): 283S-93S.
- Curtis JP, Selter JG, Wang Y, Rathore SS, Jovin IS, Jadbabaie F, et al. The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure. *Arch Intern Med*. 2005;165(1):55-61.
- Gruberg L, Weissman NJ, Waksman R, Fuchs S, Deible R, Pinnow EE, et al. The impact of obesity on the short-term and long-term outcomes after percutaneous coronary intervention: the obesity paradox? *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(4):578-84.
- Widlansky ME, Sesso HD, Rexrode KM, Manson JE, Gaziano MJ. Body mass index and total and cardiovascular mortality in men with a history of cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 2004;164(21):2326-32.
- Vane JR. Control of the circulation by endothelial mediators. Inaugural G.B. West Memorial Lecture. *Int Arch Allergy and Immunol*. 1993;101(4):333-45.
- Deng G, Long Y, Yu YR, Li MR. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-Enos Pathway. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(1):165-71.
- Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilá MB, Brunini TC, Mendes-Ribeiro AC. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defense in red blood cells from C57BL/6 mice. *Arch Biochem Biophys*. 2010;499(1-2):56-61.
- Committee on Care and Use of Laboratory animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.
- Stunkard AJ, Wadden TA, (editors). Obesity: theory and therapy. 2nd ed. New York: Raven Press; 1993.
- Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JA, Jen KL, Dunbar JC. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain Res Bull*. 2003;61(5):511-9.
- Fatani S, Pickavance LC, Sadler CJ, Harrold JA, Cassidy R, Wilding JPH, et al. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. *Nutr Metab*. 2007;4:15.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
- Cordellini S, Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. Indirect evidence for an endothelium-derived contracting factor release in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990;8(1):53-60.
- de Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol*. 2008;8:12.
- Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carison EC, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
- Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev*. 2007;28(5):463-91.
- Naderali EK, Fatani S, Williams G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):63-9.
- Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JP, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triglycerides. *Clin Sci (Lond)*. 2001;101(5):499-506.
- Naderali EK, Pickavance LC, Wilding JPH, Williams G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clin Sci (Lond)*. 2001;100(6):635-41.
- Sato J, O'Brien T, Katusic ZS, Fu A, Nygren J, Singh R, et al. Dietary antioxidant preserves endothelium dependent vasorelaxation in overfed rats. *Atherosclerosis*. 2002;161(2):327-33.
- Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA*. 1997;278(20):1682-6.
- Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension*. 2003;41(3 Pt 2):625-33.
- Jones DW, Kim JS, Andrew ME, Kim SJ, Hong YP. Body mass index and blood pressure in Korean men and women: the Korean National Blood Pressure Survey. *J Hypertens*. 1994;12(12):1433-7.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113(15):1888-904.
- Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 2002;51(1):168-73.