



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de la expresión del sistema apelinérgico (APLN/APJ) en tejido adiposo y de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina de individuos con obesidad grado III e hipertensión arterial”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias Bioquímicas**

PRESENTA:

M. en C. Luis Javier Cano Martínez

TUTOR PRINCIPAL

**Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
Facultad de Medicina**

COMITÉ TUTOR

**Dr. Samuel Canizales Quinteros
Facultad de Química (Unidad periférica INMEGEN)**

**Dr. Rafael Villalobos Molina
Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

México, CD. Mx. Noviembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1 Índice general

1. Resumen	3
2. Abstract	5
3. Introducción	7
4. Planteamiento del problema	25
5. Pregunta de investigación.....	25
6. Justificación.....	26
7. Hipótesis.....	27
8. Objetivo general	27
9. Objetivos particulares.....	27
10. Diseño metodológico.....	28
11. Consideraciones éticas	31
12. Diagrama metodológico	31
13. Métodos experimentales.....	32
14. Análisis estadístico.....	35
15. Resultados	35
16. Discusión.....	44
17. Conclusiones	51
18. Perspectivas	52
19. Artículo.....	53
20. Referencias	59
21. Anexos.....	69

Anexo 1. Cuantificación de RNA	69
Anexo 2 Integridad RNA	70
Anexo 4. Condiciones de PCR en tiempo real.....	71
Anexo 5. Carta de consentimiento informado	72

Índice de figuras

Figura 1 Isoformas de apelina.	15
Figura 2 Expresión de <i>APLN</i> y <i>APLNR</i> en el tejido adiposo.	37
Figura 3 Correlación entre expresión génica de <i>APLN</i> y <i>APLNR</i>	38
Figura 4 Comparación de la expresión de <i>APLN</i> y <i>APLNR</i> en tejido adiposo visceral y subcutáneo.	39
Figura 5 Expresión proteica de apelina en el tejido adiposo visceral	40
Figura 6 Expresión proteica del receptor de apelina en el tejido adiposo visceral	40
Figura 7 Comparación de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina.....	41
Figura 8 Comparación de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina.....	43

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación de la presión arterial	7
Tabla 2 Clasificación de la obesidad de acuerdo al IMC	9
Tabla 3 Características generales de los sujetos con obesidad grado III con y sin HTA.....	36
Tabla 4 Correlación entre la presión arterial y las concentraciones de las isoformas de apelina en el grupo de NHT.....	42

2 Lista de Abreviaturas

Abreviatura	
HTA	Hipertensión arterial
PAS	Presión arterial sistólica
PAD	Presión arterial diastólica
OMS	Organización mundial de la salud
ENSANUT 2012	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012
Ang II	Angiotensina II
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
NO	Óxido nítrico
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina II
ET1	Endotelina-1
SNS	Sistema nervioso simpático
APJ	Receptor de apelina
HIF	Factor inducible por hipoxia
NHT	Individuo con obesidad grado III sin hipertensión arterial
HT	Individuo con obesidad grado III con hipertensión arterial
PNO	Presión normal óptima
PNE	Presión normal elevada
TAV	Tejido adiposo visceral
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

1. Resumen

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica y generalmente asintomática, sin embargo es la principal causa de muerte por enfermedades cardiovasculares (ataque al corazón o accidente cerebrovascular). La HTA esencial representa más del 90% del total de pacientes con esta patología, aunque hasta este momento no se conoce su etiología. Sin embargo, los estudios epidemiológicos han establecido que la obesidad central es el principal *factor de riesgo* para desarrollar HTA esencial. Por ello, se han buscado marcadores moleculares que relacionen a la obesidad con esta enfermedad. En este sentido, se han estudiado tanto las concentraciones séricas como la expresión génica de varias adipocinas que se expresan principalmente en el tejido adiposo y que se encuentran relacionadas con la regulación de la presión arterial.

Una de estas adipocinas es apelina, la cual tiene cuatro isoformas (apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36) que al unirse a su receptor (APJ) pueden disminuir la presión arterial, pero cada una con diferente potencia. En la actualidad, se ha considerado al sistema apelinérgico (APLN/APJ) un nuevo blanco terapéutico contra la hipertensión arterial, debido a que puede disminuir la presión arterial al inducir la vasodilatación y al reprimir el efecto vasoconstrictor en las células endoteliales, además puede regular la presión arterial periférica a través del sistema nervioso simpático y el sistema renina angiotensina aldosterona. Diversos estudios han asociado a la disminución de la concentración sérica de apelina-12 con la presencia de HTA. Sin embargo, de forma paradójica sea observado que los individuos con obesidad presentan concentraciones séricas mayores de apelina-12 que los individuos con normopeso. Inclusive, algunos estudios sugieren que la elevación de apelina sérica se puede asociar con el aumento de la presión arterial. Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de la expresión del sistema APLN/APJ en el tejido adiposo y su repercusión en la concentración sérica de las isoformas de apelina en individuos con obesidad e HTA.

Por lo anterior, nosotros proponemos que los individuos con obesidad e HTA presentan una alteración en la expresión del sistema APLN/APJ en el tejido adiposo, lo que puede alterar la concentración de una o varias isoformas de apelina evitando que este sistema pueda participar en la regulación de la presión arterial. Por ello, evaluamos la expresión del sistema APLN/APJ en el

tejido adiposo central (visceral y subcutáneo) y las concentraciones de todas las isoformas de apelina en 30 individuos con obesidad grado III e HTA (HT) y los comparamos contra 45 individuos con obesidad grado III pero sin HTA (NHT). Nuestros resultados indican que la expresión del mRNA de apelina en el tejido adiposo visceral es mayor en el grupo de HT en comparación con el grupo de NHT (**p=0.045**), sin embargo esta diferencia no se observó a nivel de proteína ($p>0.05$). Mientras que en el tejido adiposo subcutáneo no encontramos diferencias entre los grupos ($p>0.05$). Por otro lado, encontramos que la expresión génica de APJ en el tejido adiposo visceral se encuentra disminuida en el grupo de HT al compararla contra el grupo de NHT (**p=0.010**), esta diferencia se mantuvo a nivel de proteína (**p=0.005**). Mientras que en el tejido adiposo subcutáneo no se observaron diferencias entre los grupos ($p>0.05$). Por otra parte, ninguna de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina (apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36) presentaron diferencias entre los grupos ($p>0.05$). Sin embargo, encontramos una correlación positiva entre apelina-17 con los valores de PAS (**r=0.323; p=0.035**), no así para las otras isoformas ($p>0.05$). Finalmente, al estratificar al grupo NHT en individuos con presión normal óptima (NBP) y presión normal elevada (EBP), encontramos que la isoforma de apelina-17 se encuentra incrementada en el grupo de individuos con EBP al compararlo contra el grupo de NBP (**p=0.049**) e incluso contra el grupo de HT (**p=0.001**).

En conclusión, este es el primer trabajo que reporta que la disminución de la expresión génica y proteica del receptor APJ en el tejido adiposo visceral se asocia con la presencia de HTA en individuos con obesidad. Además es el primero en sugerir que el aumento en la concentración sérica de apelina-17 puede ser un marcador temprano de HTA en los individuos con obesidad.

2. Abstract

High blood pressure (HTA) is a chronic and usually asymptomatic disease, however it is the main cause of death due to cardiovascular diseases (heart attack or stroke). Essential hypertension represents more than 90% of the total patients with this pathology, although its etiology is not known until this moment. However, epidemiological studies have established that central obesity is the main risk factor for developing essential hypertension. Therefore, molecular markers that relate to obesity with this disease have been sought. In this sense, both serum concentrations and gene expression of several adipokines (leptin, adiponectin and apelin) have been studied. These are expressed mainly in adipose tissue and are related to the regulation of blood pressure.

Apelin is an adipokine that has four isoforms (apelin-12, apelin-13, apelin-17 and apelin-36) which participate in the regulation of blood pressure by binding to its receptor (APJ), but each with different power. Currently, the apelinergic system (APLN / APJ) has been considered a new therapeutic target against arterial hypertension, because it can lower blood pressure by inducing vasodilation and suppressing the vasoconstrictor effect in endothelial cells, in addition it can regulate peripheral blood pressure through the sympathetic nervous system and the renin angiotensin aldosterone system. Several studies have associated the increase in the serum concentration of apelin-12 with the decrease in blood pressure and, on the other hand, the decrease in the concentration of apelin-12 with the presence of hypertension. However, paradoxically, it is observed that individuals with obesity have higher serum levels of apelin-12 than individuals with normal weight. Some studies suggest that high concentrations of apelin can be associated with increased blood pressure. However, little has been studied about the expression of the APLN / APJ system in adipose tissue and its impact on the serum concentration of the apelin isoforms.

Therefore, we propose that individuals with obesity and HTA present an alteration in the expression of the APLN/APJ system in adipose tissue, which may alter the concentration of one or several isoforms of apelin, preventing this system from participating in the regulation of blood pressure. Therefore, we evaluated the expression of the APLN/APJ system in the central adipose tissue (visceral and subcutaneous) and the concentrations of all isopelmic isoforms in 30 individuals with obesity grade III and HTA (HT) and compared them against 45 individuals with obesity grade III but without HTA (NHT). Our results indicate that the expression of the apelin mRNA in the

visceral adipose tissue is higher in the HT group compared to the NHT group ($p = 0.045$), however this difference was not observed at the protein level ($p > 0.05$). While in the subcutaneous adipose tissue we did not find differences between the groups ($p > 0.05$). On the other hand, we found that gene expression of APJ in visceral adipose tissue is decreased in the HT group when compared against the NHT group ($p = 0.010$), this difference was maintained at the protein level ($p = 0.005$). While in the subcutaneous adipose tissue no differences were observed between the groups ($p > 0.05$). On the other hand, none of the serum concentrations of the apelin isoforms (apelin-12, apelin-13, apelin-17 and apelin-36) showed differences between the groups ($p > 0.05$). However, we found a positive correlation between apelin-17 with systolic blood pressure values ($r = 0.323$, $p = 0.035$), but not for the other isoforms ($p > 0.05$). Finally, by stratifying the NHT group in individuals with optimal normal pressure (NBP) and high normal pressure (EBP), we found that the apelin-17 isoform is increased in the group of individuals with EBP when compared against the group of NBP ($p = 0.049$) and even against the HT group ($p = 0.001$).

In conclusion, this is the first work that reports that the decrease in gene and protein expression of the APJ receptor in visceral adipose tissue is associated with the presence of hypertension in individuals with obesity. He is also the first to suggest that the increase in serum concentration of apelin-17 may be an early marker of hypertension in obese individuals.

3. Introducción

3.1. Hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad asintomática que en algunas ocasiones puede causar dolor de cabeza, dificultad respiratoria, vértigos, dolor torácico, palpitaciones del corazón y hemorragias nasales y que si no es controlada puede causar la muerte debido a complicaciones cardiovasculares.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la HTA como el incremento sostenido de la presión arterial sistólica (PAS) y/o presión arterial diastólica (PAD). Esta enfermedad es diagnosticada en los adultos cuando la PAS es igual o mayor a 140 mm Hg y/o la PAD es igual o mayor a 90 mm Hg en el promedio de tres mediciones, esto de acuerdo a la Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología, lo cual es utilizado por la Norma Oficial Mexicana para la prevención, tratamiento y control de la HTA. A su vez, la HTA se clasifica de acuerdo a los valores de PAS y PAD en grado I y grado II (ver tabla 1) (Mancia et al., 2013).

Tabla 1 Clasificación de la presión arterial

Valores de presión arterial (mm Hg)		
Categoría	Presión sistólica (PAS)	Presión diastólica (PAD)
Nivel óptimo	<120	< 80
Normal	120 – 129	80 – 84
Normal alta	130 – 139	85 – 89
Hipertensión arterial	\geq 140	\geq 90
Grado I	140 – 159	90 – 100
Grado II	\geq 160	\geq 100

Tomado de Mancia et al., 2013

3.2. Epidemiología de la hipertensión arterial

De acuerdo a la OMS las enfermedades cardiovasculares son responsables de aproximadamente 17 millones de muertes por año a nivel mundial, y entre ellas se encuentran las complicaciones causadas por la HTA (la cardiopatía isquémica y por accidente cerebrovascular), las cuales provocan la muerte de aproximadamente 9.4 millones de personas al año.

En todo el mundo, aproximadamente mil millones de personas padecen HTA. En nuestro país, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 la prevalencia de HTA es de 31.5% en los adultos mayores de 20 años (IC 95% 29.8-33.1). Además, esta encuesta reportó que al estratificar a los individuos de acuerdo al índice de masa corporal, los individuos que presentan obesidad de acuerdo a su índice de masa corporal presentan una prevalencia mayor de HTA con un 42.3% (IC 95% 39.4-45.3) con respecto a los individuos con normopeso que presentan una prevalencia de 18.5% (IC 95% 16.2-21.0). De acuerdo al Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) México ocupa actualmente el primer lugar en obesidad infantil y segundo lugar en adultos a nivel mundial, colocando a la población mexicana en un elevado riesgo de desarrollar HTA y problemas cardiovasculares tanto en la actualidad como en el futuro.

3.3. Etiología de la hipertensión arterial esencial

La HTA se clasifica de acuerdo a su etiología en HTA primaria o esencial y en HTA secundaria. La HTA esencial representa a más del 90% de todos los casos de HTA, su etiología es desconocida por lo que se ha descrito como una enfermedad compleja en la que participan diferentes componentes en su desarrollo como lo son la edad, la dieta, el sexo (masculino), la predisposición genética y algunas comorbilidades tales como la diabetes, las dislipidemias y la obesidad. Siendo la obesidad y en particular la obesidad central el principal *factor de riesgo* para su desarrollo (Neter et al., 2003; Shihab et al., 2012). Mientras, que la HTA secundaria representa el resto de los casos de HTA y es causada por abuso en el consumo de fármacos o drogas, alteraciones endocrinas o enfermedad renal (Oparil et al., 2003).

3.4. La Obesidad

Por su parte, la obesidad es definida como la acumulación excesiva de tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Este se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m²).

De acuerdo al IMC la obesidad se clasifica en tres grupos (obesidad grado I, II y III) (ver tabla 2).

Tabla 2 Clasificación de la obesidad de acuerdo al IMC

Categoría	IMC
Normal	18.5-24.9
Sobrepeso	25-29.9
Obesidad	≥30
Grado I	30-34.9
Grado II	35-39.9
Grado III	≥40

IMC: índice de masa corporal. Tomado y modificado de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

3.5. Hipertensión arterial y obesidad

La obesidad se ha asociado con una larga lista de entidades patológicas (Bastien et al., 2014) y son varios los estudios que han demostrado que la obesidad está fuertemente asociada con el desarrollo y el agravamiento de la HTA (Kannel et al., 1967; Kisseba et al., 1982; Garrison et al., 1987). El primer estudio que reveló la relación entre la HTA y la obesidad fue realizado en 1967, a partir de un análisis prospectivo de los datos recabados del Estudio del Corazón de Framingham (Kannel et al., 1967). Este estudio encontró una relación entre el tejido adiposo que se distribuye en y por encima de la cintura con el desarrollo de HTA. Posteriormente, otros estudios incluyeron la

resistencia a la insulina y la hipertrigliceridemia como factores importantes para el desarrollo de HTA (Kisseba et al., 1982).

Además, se ha observado que los individuos con obesidad desarrollan HTA a edades más tempranas. Un estudio realizado en 28,325 individuos de origen étnico japonés muestra que los individuos con obesidad presentan HTA con mayor frecuencia entre los 30 y 37 años (Wakabayashi et al., 2012). Por su parte, los ensayos clínicos han demostrado que la pérdida del peso corporal (aproximadamente 10%) causada por la restricción calórica y/o por el aumento de la actividad física, disminuyen significativamente la presión arterial y la mortalidad por enfermedad cardiovascular (Neter et al., 2003). Recientemente, un estudio longitudinal de 46 años, demostró que la obesidad incrementa a 1.91 (1.46-2.49) el riesgo repentino de desarrollar HTA y que este riesgo se pierde cuando las personas con obesidad regresan al peso normal 0.91 (0.43-1.92) (Shihab et al., 2012).

3.6. Participación de la obesidad en el desarrollo de la HTA

Varios son los mecanismos que tratan de explicar la participación de la obesidad en el desarrollo de la HTA, entre ellos se encuentran: la dieta, la disfunción renal, la alteración en el sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) y la disfunción vascular.

3.6.1. Dieta

Se ha determinado que la dieta juega un papel importante en el desarrollo de la HTA asociada a la obesidad, lo cual es atribuido al consumo excesivo de alimentos ricos en energía por parte de las personas que presentan obesidad, los cuales son altos en azúcar, grasa y sodio, que en combinación con el estilo de vida y el sedentarismo se asocian con el desarrollo de HTA (Malik et al., 2012).

3.6.2. Disfunción renal

Varios estudios en modelos animales de obesidad han demostrado que la disfunción renal también participa en el desarrollo de la HTA (Brown et al., 2013). Esto es debido a que la obesidad

incrementa la absorción de sodio, lo que promueve un cambio en la natriuresis, llevando a un aumento en la presión arterial en respuesta al incremento de sodio en plasma (Johnson et al., 2005). Este aumento también se puede deber a la compresión de la médula renal, provocado por el incremento de adiposo de tejido y la acumulación de matriz extracelular.

3.6.3. Alteración del sistema renina angiotensina aldosterona

Se ha observado que los individuos con obesidad presentan una activación incrementada del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), lo que se ha asociado con el desarrollo de la HTA. Esto es debido a que el SRAA regula la presión arterial a través de diferentes mecanismos como: la activación del sistema nervioso simpático (SNS), el manejo del sodio renal y la síntesis de angiotensina II (AngII) (Szasz et al., 2013) y aldosterona (Aroor et al., 2013; Bender et al., 2013).

3.6.4. Disfunción vascular

La disfunción vascular está dada por la rigidez arterial y la disfunción endotelial. Diversos estudios han reportado que los individuos con obesidad presentan un aumento en la rigidez arterial y que los individuos que se encuentran en el cuartil más alto de rigidez arterial presentan un alto riesgo de desarrollar HTA (Femia et al., 2007; Cavalcante et al., 2011). Otros estudios, han sugerido que la disfunción endotelial también contribuye a rigidez vascular, que a su vez está fuertemente asociada con resistencia a la insulina (Aroor et al., 2013). La función vascular es regulada por dos componentes: la señalización metabólica y los factores de crecimiento. La señalización metabólica es a través del sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1) y de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS); mientras que la señalización de factores de crecimiento es a través de las quinasas reguladas por señales extracelular 1/2 (ERK1/2) y de la endotelina-1 (ET1) (Bender et al., 2013; Muniyappa et al., 2013). En estados de resistencia a la insulina, frecuente en los individuos con obesidad, la señalización metabólica se encuentra alterada debido a la fosforilación de la serina en IRS-1, lo que conduce a una reducción de la biodisponibilidad de NO y a un deterioro en la relajación vascular. Además, en este estado, la activación de la vía de ET1 contribuye a un aumento de contracción celular de las células endoteliales (Muniyappa et al., 2013). El desequilibrio en la

activación de la señalización de la insulina presente en los individuos con obesidad puede contribuir a la disfunción endotelial y a la rigidez arterial, y asociarse con el desarrollo de HTA.

Sin embargo, todos estos mecanismos explican la participación indirecta en la que la obesidad participa en el desarrollo de la HTA. Por ello, actualmente varias investigaciones se han enfocado en entender el aporte de la obesidad y en particular la participación del tejido adiposo central en el desarrollo de la HTA.

3.7. Tejido adiposo

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo formado principalmente por adipocitos y por las células de la fracción del estroma vascular que incluye a los pre-adipocitos, los fibroblastos, las células endoteliales y a células del sistema inmunológico como los macrófagos. Los adipocitos son células especializadas en almacenar lípidos, principalmente triglicéridos y ésteres de colesterol, los cuales son almacenados en gotas de grasa localizadas en el citoplasma de los adipocitos, por lo que se ha establecido que estas células participan de forma importante en la homeostasis energética (Cannon y Nedergaard, 2004; Mariman y Wang, 2010).

El tejido adiposo se divide en tejido adiposo blanco y en tejido adiposo café. El tejido adiposo blanco se encuentra conformado por adipocitos que se caracterizan en almacenar los lípidos en una sola gota de grasa la cual puede ocupar hasta el 90 % del citoplasma del adipocito, por ello se dice que el tejido adiposo blanco es especialista en almacenar energía. Mientras que los adipocitos del tejido adiposo café se caracterizan por almacenar los lípidos en varias gotas de grasa de menor tamaño, además de contar con un número elevado de mitocondrias, lo que le permite al tejido adiposo café regular la temperatura corporal (termogénesis) a través de la disipación de energía. En una persona adulta el porcentaje de tejido adiposo blanco es mayor al 90% por lo que una de las principales funciones del tejido adiposo en los adultos es almacenar energía.

El tejido adiposo blanco se clasifica por su ubicación en tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo. El tejido adiposo visceral se encuentra alrededor de los órganos internos principalmente en la región omental, por lo que tiene una interacción directa con diferentes órganos

como el hígado, el páncreas entre otros, sus funciones son el soporte estructural y el almacenamiento de energía. Mientras que el tejido adiposo subcutáneo se localiza en la capa más profunda de la piel principalmente en el abdomen, en los glúteos y en los depósitos femorales, sus funciones son el almacenaje de energía, el soporte estructural y como aislante del frío y el calor (Cannon y Nedergaard, 2004; Mariman y Wang, 2010).

Recientemente, se ha establecido que el tejido adiposo no solo tiene la función de almacenar energía y regular la termogénesis, sino que se ha descrito como un órgano endocrino que es capaz de participar en la regulación diferentes procesos metabólicos a través de la expresión y secreción de las adipocinas.

3.8. Adipocinas

Las adipocinas son péptidos o proteínas que son producidas principalmente por el tejido adiposo y tienen actividad hormonal del tipo autocrino, paracrino o endocrino. En este sentido, el efecto autocrino de las adipocinas en el propio tejido adiposo tiene que ver con la regulación de la adipogénesis, la migración de las células del sistema inmune al tejido adiposo, la función y el metabolismo del tejido adiposo. Mientras que su función endocrina tiene que ver con la regulación del apetito, la distribución de la grasa, la secreción y sensibilidad de la insulina, al gasto energético, la función endotelial, la inflamación, la presión arterial y la homeostasis (Cortés et al., 2014).

Por lo anterior, los cambios en la expresión y secreción de las adipocinas observados en la obesidad, podrían explicar las alteraciones inmunológicas, metabólicas y cardiovasculares relacionadas a esta enfermedad. Sin embargo, el entendimiento de los mecanismos moleculares que vinculan a la disfunción del tejido adiposo con las alteraciones metabólicas y cardiovasculares es incompleta hasta el momento (Maenhaut y Van de Voorde, 2011; Cortés et al., 2014).

Como se ha mencionado anteriormente, el incremento del tejido adiposo central (visceral y subcutáneo) se correlaciona con el aumento en la susceptibilidad de presentar complicaciones metabólicas. Sin embargo, numerosos estudios han descrito correlaciones diferenciales entre los depósitos de tejido adiposo (visceral y subcutáneo) y los riesgos metabólicos en los seres humanos,

presumiblemente debido a las diferencias intrínsecas en la función del tejido adiposo, que incluyen a la expresión de las adipocinas entre estos tejidos (visceral y subcutáneo). En este sentido, la expresión diferencial de adipocinas como leptina, adiponectina y apelina entre el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo, se han propuesto como el vínculo entre la obesidad y la HTA (Yiannikouris et al., 2014).

3.9. Apelina

La apelina fue descubierta por Tatemoto et al., en 1998 y es uno de los ligandos endógenos del receptor APJ. El precursor de apelina es un polipéptido de 77 residuos de aminoácidos llamado pre-pro-apelina que no presenta actividad biológica pero que al ser escindido, genera varias isoformas bioactivas (apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36), las cuales presentan una homología de secuencia del 75-95% entre el humano, la rata y el ratón (Lee et al., 2000). El primer corte realizado a la pre-pro-apelina se lleva a cabo cerca del extremo amino terminal, en los residuos de lisina y arginina, lo que da lugar a la pro-apelina, un polipéptido de 55 residuos de aminoácidos que se escinde adicionalmente para formar a las isoformas bioactivas de apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36 (fig. 1). Estos cortes son realizados por endopeptidasas en diferentes tejidos como: la enzima PCK-3 (EC 3.4.21.75) en el tejido adiposo (Shin et al., 2013) y PRCP (EC 3.4.16.2) en placenta (Kehoe et al., 2016). Cada uno de estos fragmentos tiene una región C-terminal conservada, que es esencial para la unión a su receptor APJ y por ende en su actividad funcional (Pitkin et al., 2010). Se ha descrito que la isoforma de apelina-13 puede sufrir una modificación postraducciona por la enzima glutamil ciclasa que lleva a la ciclación en el extremo amino terminal, generando la isoforma pyr-apelina-13, lo que le confiere estabilidad y una vida media mayor, por lo que se ha sugerido que es la isoforma que tiene una acción biológica más prolongada (Zhen et al., 2013).

La apelina es altamente propensa a la degradación proteolítica, lo que limita su tiempo de acción (Japp et al., 2008), su vida media es corta, la cual es de aproximadamente entre 1 y 5 minutos (Wang et al., 2016). La inactivación de apelina depende de la escisión del residuo de fenilalanina del extremo carboxilo terminal, el cual es catalizado por la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2) (Vickers et al., 2002). Algunos estudios, han descrito que la pyr-apelina-13 es más

susceptible a la inactivación por ACE2 en comparación con apelina-17, aunque ambas generan isoformas cortas (pyr-apelina-12 y -16) que tienen poca actividad funcional (Wang et al., 2016). Sin embargo, también se ha descrito que ACE2 al catalizar la conversión de pyr-apelina-13 a pyr-apelina-13₍₁₋₁₂₎, genera una isoforma con actividad biológica en el corazón, sugiriendo que una mayor expresión de ACE2 podría ser benéfico durante enfermedades cardiovasculares (Yang et al. 2017). Por otro lado, se ha demostrado que la neprilisina (una metaloproteasa) también se encuentra implicada en la degradación de apelina, debido a que se ha observado que esta proteína genera un corte entre la leucina que se encuentra en la posición 5 y la serina que se encuentra en la posición 6 de la apelina-13, provocando que ésta sea incapaz de activar a su receptor APJ (McKinnie et al., 2016).

La apelina es codificada por el gen *APLN* que se localiza en el cromosoma X q 2.5-2.6 y aunque se localiza en el cromosoma X no existe diferencia en la expresión génica entre hombres y mujeres (Butruille et al., 2013). Este gen se expresa fuertemente en el tejido adiposo, tanto en los adipocitos como en las células del estroma vascular por lo que ha sido definido como una adipocina (Boucher J., 2005), pero también se expresa en otros lugares como en el corazón, el cerebro, el riñón, la glándula suprarrenal, el pulmón y el endotelio vascular (Kleinz et al., 2004).

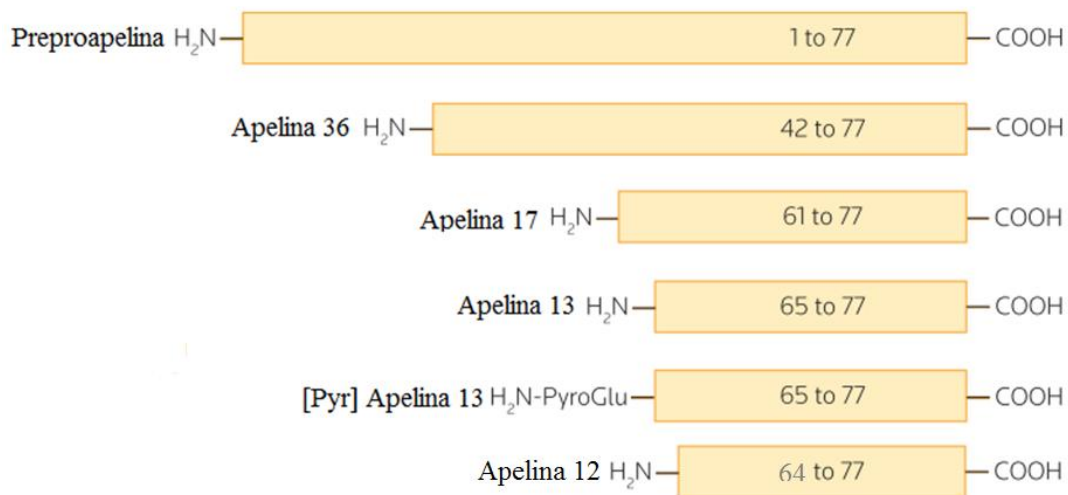


Figura 1 Isoformas de apelina. El gen *APLN* codifica para un péptido de 77 aminoácidos llamado preproapelina, el cual sufre un procesamiento proteolítico generando diferentes isoformas cortas con actividad biológica (apelina-36, apelina-17, apelina-13, [Pyr]-apelina-13 y apelina-12) (tomado y modificado de Kalea y Batlle, 2010).

La expresión génica de apelina es regulada positivamente por diversos factores como: la inflamación (Daviaud et al. 2006; Han et al., 2008), los lipopolisacáridos (Han et al., 2008), la hipoxia (Eyries et al., 2008; Glassford et al., 2007) y la insulina (Boucher et al., 2005). La inflamación induce la expresión génica de la apelina a partir de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el tejido adiposo de humano y de ratón (Daviaud et al. 2006) y el tratamiento con lipopolisacáridos e interleucina 6 (IL-6) (que provoca un estado inflamatorio sistémico) a través de la activación del promotor de apelina por la unión de STAT3 (Han et al., 2008). Asimismo, se ha descrito que la región promotora de apelina presenta un sitio de unión para el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α), el cual en presencia de hipoxia induce la expresión de apelina en el tejido adiposo (Geiger et al, 2011) y en células endoteliales de arterias pulmonares humanas (Eyries et al., 2008). En humanos, la hiperinsulinemia regula positivamente la expresión génica de apelina en el tejido adiposo e incrementa su liberación a través de las vías de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa C (PKC) (Castan-Laurell et al., 2008). Por último, se ha descrito que los cambios epigenéticos también regulan la expresión génica de apelina debido a que se ha reportado que la metilación del DNA en la región UTR 5' del gen *APLN* se asocia con la disminución en su expresión génica en individuos con edema pulmonar de altitud (Mishra et al., 2015).

3.10. Receptor de apelina (APJ)

El receptor de apelina (APJ) fue descubierto en 1993 durante la búsqueda de los receptores de vasopresina. El receptor APJ es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), los cuales se caracterizan por presentar siete asas transmembranales, un extremo carboxilo terminal intracelular y un extremo amino terminal extracelular. Además, estos tipos de receptores presentan sitios de modificación postraduccionales para fosforilación, palmitoilación y glicosilación junto con sitios de asociación para β -arrestina (O'Dowd et al., 1993; Hosoya et al., 2000).

Este receptor es codificado por el gen *APLNR* que se localiza en el cromosoma 11 q 1.2, el cual se expresa en varios órganos y tejidos como: el corazón, el cerebro, el musculo esquelético, el pulmón, la placenta y el tejido adiposo. Sin embargo, un estudio reciente demostró que su expresión es mayor en las células endoteliales que recubren tanto al musculo como al tejido adiposo que en los

propios tejidos (Hawngbo et al., 2017). Además, algunos estudios inmunocitoquímicos han detectado al receptor APJ en células endoteliales y de músculo liso en varios tipos de vasos sanguíneos, en los que se incluyen a las arterias coronarias, a la vena safena humana y a la aorta de rata (Katugampola et al., 2001; Kleinz et al., 2005; Mughal et al., 2018). Se ha demostrado que la expresión de *APLNR* es inducida por apelina a través del factor Krüppel tipo 2 (KLF2) (McClellan et al., 2012) en las células endoteliales, por insulina en el tejido adiposo (Boucher J., 2005), entre otros, y su expresión es inhibida por el estrés oxidativo en el tejido adiposo (Than et al., 2014).

3.11. Vías de transducción de señales del sistema APLN/APJ

Las vías de señalización de los GPCR son altamente complejas y aunque los efectos fisiológicos y las vías de transducción de señales se han caracterizado de acuerdo a la clase del GPCR, los fenómenos a nivel molecular no se comprenden claramente y el receptor APJ no es la excepción. La señalización a través del receptor APJ es heteróloga, debido a que este receptor puede activar vías dependientes de múltiples proteínas G, pero también vías independientes a proteína G, además estos receptores pueden formar homodímeros o heterodímeros lo que modifica su afinidad y potencia, y por último son diferentes las isoformas de apelina las que se unen a este receptor. Teniendo en cuenta todo lo anterior, es claro porque el sistema apelina/APJ es capaz de mediar tantos efectos en diferentes tipos de células y porque en algunos casos estos efectos son aparentemente contradictorios.

La señalización del sistema APLN/APJ dependiente de la activación de proteína G se lleva a cabo a través de varias subunidades de GPCR $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $\beta\gamma$, las cuales activan diferentes vías de señalización. El sistema APLN/APJ puede activar la vía de señalización dependiente de las subunidades $G\alpha_i$, las cuales se caracterizan por inhibir a la adenilato ciclasa y a la proteína quinasa A (PKA). Esta vía también puede inducir la activación de PI3K/Akt y activar a la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), incrementado la producción de óxido nítrico (NO) y favorecer la vasodilatación (Tatemoto, et al., 1998).

Las subunidades $G\alpha_q$ y $\beta\gamma$ también pueden inducir la activación de la eNOS y la producción de NO, a través de la vía de señalización de PI3K/Akt (Murga et al., 1998). Sin embargo, cuando el sistema apelina/APJ activan esta vía de señalización en las células vasculares de musculo liso (CVML) se induce la activación de la fosfolipasa C beta (PCL β), inositol trifosfato y proteína quinasa C (PKC) lo que permite la fosforilación de la cadena ligera de miosina generando vasoconstricción (Hashimoto et al., 2014).

Por otro lado, se ha descrito que la señalización del sistema APLN/APJ independiente de la activación de proteína G también participa en la disminución de la presión arterial en el modelo animal (El Messari et al., 2004). Esto lo hace a través de la endocitosis del receptor APJ mediada por β -arrestina y las quinasas de los receptores acoplados a proteína G (GRK), lo que induce la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Aparte de estos mecanismos intracelulares, los receptores APJ también tienen la capacidad de formar heterodímeros. Se ha descrito que los receptores APJ se heterodimerizan con receptores de angiotensina (AT1) (Siddiquee et al., 2013), receptores opioides κ (KOR) (Li et al., 2012), receptor de neurotensina-1 (NTSR1) (Bai et al., 2014) y receptores de bradiquinina (B1) (Bai et al., 2014b).

Se ha descrito que el receptor APJ puede formar un heterodímero con el receptor AT1 y así disminuir la afinidad con la angiotensina II (Ang II) (Siddiquee et al., 2013). De manera similar, los heterodímeros constitutivos de los receptores APJ y bradiquinina (B1) regulan positivamente la fosforilación de eNOS, posiblemente mediante el fortalecimiento de la asociación del dímero con las subunidades $G\alpha_q$ (Bai et al., 2014).

3.12. El sistema APLN/APJ y la regulación de la presión arterial

Varios estudios transversales han demostrado que el sistema APLN/APJ participa en la disminución la presión arterial en personas sanas. Un estudio realizado por Zhu et al en 2013, en el que se cuantificó la concentración sérica de la apelina en 1021 individuos de origen étnico chino para conocer su relación con los valores de presión arterial, demostró que existe una correlación negativa entre la concentración sérica de apelina-12 y los valores de presión arterial sistólica (PAS)

y presión arterial diastólica (PAD)- En otro estudio en el que se estratificó a 60 individuos sin hipertensión arterial de acuerdo a los valores de presión arterial en: presión arterial normal (<120/80) u óptima (120-129/80-84 mmHg) y en presión arterial elevada (130–139/85–89 mmHg), reportó que los individuos con presión arterial normal u óptima presentaron concentraciones mayores de apelina-12 al compararla contra los individuos con presión arterial elevada (Liakos et al., 2016). Estos estudios demuestran que el sistema APLN/APJ participa en la disminución de la presión arterial.

Para explicar lo anterior, varios estudios se han enfocado en describir los mecanismos por lo que el sistema APLN/APJ regula la presión arterial. Se ha descrito que este sistema puede regular la presión arterial a través de sistema vascular, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y el sistema nervioso simpático (SNS).

3.13. Regulación de la presión arterial por el sistema apelina/APJ a través del sistema vascular

La homeostasis del sistema vascular es indispensable para mantener los niveles de presión arterial normal, esto se logra a través del equilibrio entre la vasodilatación y la vasoconstricción; sin embargo, bajo condiciones de estrés endotelial este equilibrio se puede perder favoreciendo el incremento de la presión arterial.

Se ha descrito que el sistema APLN/APJ puede mantener la homeostasis vascular al inducir la vasodilatación en células endoteliales, no obstante bajo ciertas condiciones, este sistema puede inducir la vasoconstricción en las células vasculares de músculo liso (CVML), lo que se puede traducir en un incremento de la presión arterial.

3.14. Participación del sistema apelina/APJ en la disminución de la presión arterial por el sistema vascular

El primer informe que describió el efecto vasodilatador del sistema APLN/APJ fue realizado por Lee et al en 2000. En este estudio se demostró que la inyección intraperitoneal de apelina, reduce la presión sistólica y diastólica en animales normotensos anestesiados. Posteriormente, otro estudio demostró que el efecto hipotensor lo realiza al inducir la vasodilatación en las células endoteliales a través de la activación de la eNOS, ya que al utilizar un inhibidor de esta enzima, el éster metílico de N (G) -nitro-L-arginina (L-NAME), el efecto hipotensor de apelina se redujo.

Asimismo, se observó que la potencia de este efecto, dependía de cual isoforma de apelina se unía a su receptor APJ, revelando que el efecto hipotensor de cada una de las isoformas de apelina es distinto entre ellas. (Tatemoto et al., 2001). El mismo grupo de investigación describió que la isoforma de apelina-12, es la isoforma que presenta un mayor efecto hipotensor en comparación con apelina-13 y que la isoforma de apelina-36 no presenta un efector hipotensor a través de la vasodilatación. Ulteriormente, diversos estudios reportaron que el efecto vasodilatador del sistema APLN/APJ se lleva a cabo por la activación de la eNOS tanto en arterias periféricas aisladas tanto de humano como de ratón (Salcedo et al., 2007), así como en la aorta de rata aislada (Jia et al., 2007).

3.15. Participación del sistema apelina/APJ en el aumento de la presión arterial por el sistema vascular

Por otro parte, se sabe que el receptor APJ se expresa en CVML y que su activación da como resultado vasoconstricción (Hashimoto et al., 2006) lo que se relaciona con el incremento de la presión arterial. En este sentido, algunos estudios han demostrado que el sistema apelina/APJ incrementa la presión arterial. En estos estudios, se demostró que la administración sistémica de apelina favorece una respuesta vasoconstrictora (Hashimoto et al., 2006). Otro estudio realizado en ratas conscientes demostró que la administración intravenosa de apelina, aumentó en forma dependiente de dosis la presión arterial media (Kagiyama et al., 2005).

Aunque se han realizado pocos estudios con vasos sanguíneos aislados, se sabe que la apelina generalmente induce la relajación de arterias aisladas con endotelio intacto (como se describió anteriormente), sin embargo se ha observado que apelina induce vasoconstricción en vasos aislados sin endotelio y en condiciones en las que las células endoteliales están dañadas o son disfuncionales. Un estudio en modelo murino de disfunción endotelial generado por la administración de ADMA (inhibidor endógeno de eNOS), reveló que la administración de apelina-13 exógena induce vasoconstricción en las CVML y un incremento en la presión arterial de estos animales³⁰. Además, se ha demostrado que la vasoconstricción causada por apelina es causada por el aumento en la fosforilación de la cadena ligera de miosina por la activación de PKC en la aorta torácica de ratón (Hashimoto et al., 2006).

3.16. El sistema APLN/APJ en la regulación del SRAA

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) se encuentra tanto en el sistema circulatorio como en las paredes de los vasos sanguíneos, por lo que participa regulando el tono vascular y mantenimiento de la presión arterial. La angiotensina II (Ang II) es uno de los componentes más importantes del SRAA, debido a que presenta un poderoso efecto vasoconstrictor, además se ha descrito que puede inducir la disfunción endotelial e inflamación por lo que es un importante factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, se sabe que el SRAA regula la secreción de aldosterona, hormona relacionada con el incremento de la presión arterial por la retención de sodio.

Diversos estudios han demostrado que el sistema APLN/APJ puede revertir la reactividad vascular aortica anormal causada por Ang II y acetilcolina, a través de la activación de la vía de señalización de Akt y eNOS en un modelo murino de diabetes tipo II (Zhong et al., 2007). Asimismo, estudios *in vitro* sugieren que el sistema APLN/APJ pueden inhibir al receptor de Ang II tipo I (AT1) mediante una mecanismo de trans-inhibición alostérica, impidiendo que Ang II se una a su receptor y ejerza su efecto vasoconstrictor (Siddique et al., 2013). Por lo que, el sistema APLN/APJ no solo induce la vasodilatación sino también regula el efecto vasoconstrictor inducido por Ang II lo que permite disminuir la resistencia vascular periférica y mantener la homeostasis vascular.

3.17. El sistema APLN/APJ y la hipertensión arterial

Debido a que el sistema APLN/APJ regula la presión arterial por diferentes mecanismos se ha propuesto que alteraciones en este sistema se relacionan con el desarrollo de la HTA. Los primeros estudios fueron realizados en modelos de pérdida de la función del APLN/APJ. En uno de ellos, se analizó los cambios en la presión arterial en ratones nulos para el receptor APJ, estos ratones desarrollaron hipertensión arterial espontánea (Ishida et al., 2004). Posteriormente, otro estudio analizó en un modelo murino el efecto nulo tanto para apelina como para su receptor (APJ). Estos ratones crecieron hasta la edad adulta pero presentaron problemas en la contracción cardíaca y una disminución en la capacidad de actividad física (Charo et al., 2009). En relación a lo anterior, algunos estudios han reportado que los niveles de expresión génica y proteica del receptor APJ se reducen en el corazón, riñón y aorta de ratas hipertensas (Najafipour, et al., 2012; Najafipour, et al., 2015).

Debido a estos resultados, varios estudios han buscado la asociación entre alteraciones en el sistema APLN/APJ con el desarrollo de HTA en humanos. En este sentido, estudios transversales realizados en pacientes con HTA, revelaron que estos individuos presentan concentraciones menores de apelina en plasma en comparación con individuos sanos. Aunado a lo anterior, los pacientes con concentraciones más bajas de apelina (correspondiente al tercil más bajo) presentaron alteraciones severas en la función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo (Przewlocka et al., 2011).

Por otra parte, se ha establecido que la interacción entre apelina y su receptor es indispensable para ejercer su efecto, algunos estudios han revelado que cambios en la secuencia de apelina afectan su función hipotensora, principalmente en el residuo de fenilalanina que se localiza en el extremo carboxi-terminal (Lee et al., 2005). Por lo que varios estudios se enfocaron en estudiar los cambios sobre la secuencia génica de apelina y su receptor (APJ), y su asociación con la HTA. Estos estudios han encontrado la asociación de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) tanto el gen *APELINA* (rs3761581y rs56204867) como en el gen *APLNR* rs7119375 y rs10501367 con la HTA en población de origen étnico chino (Niu et al., 2009) (Li et al., 2009) y en población de origen étnico mestizo-mexicano (Esteban-Martínez et al., 2016).

3.18. El sistema Apelina/APJ como blanco terapéutico para la hipertensión arterial

Debido a la participación del sistema APLN/APJ en la regulación de la presión arterial, varios estudios han desarrollado análogos de apelina que puedan llevar a cabo su efecto hipotensor. Algunos de estos estudios se han enfocado en diseñar análogos de apelina-17. Uno de ellos, son los análogos de apelina-17 (P92 y LIT01-196), los cuales se caracterizan por ser muy estables en plasma (vida media > 24 h para LIT01-196) en comparación con apelina-17 (4.6 min), presentar una afinidad subnanomolar por el receptor APJ y por comportarse como agonistas completos al activar la señalización a través de la proteína G y a la internalización del receptor APJ. Además, los ensayos de *ex vivo*, demostraron que estos compuestos indujeron vasodilatación en la aorta de rata y en las arteriolas glomerulares y generaron un aumento de la contractilidad cardíaca. Reforzando lo anterior, los ensayos *in vivo* llevados a cabo en ratones privados de agua, mostraron que después de la administración intracerebroventricular, los agonistas P92 y LIT01-196 fueron 6 y 160 veces más eficientes en inhibir la liberación de vasopresina sistémica que apelina-17 (Gerbier et al., 2016).

Sin embargo, es importante mencionar que el uso de estos agonistas han tenido limitaciones, debido a que es bien conocido que todos los receptores acoplados a proteína G pueden sufrir una desensibilización después de ser estimulados constantemente, lo que provoca la internalización del receptor a través de β arrestina. Por lo que, algunos estudios han planteado que algunos agonistas puedan estabilizar diferentes estados conformacionales y de esta forma estimular selectivamente la vía de la proteína G o de β -arrestina para funcionar como un agonista parcial.

Recientemente, fue diseñado un agonista de este tipo el MM07, el cual presenta un efector vasodilatador en la vasculatura de personas sanas e incrementa el gasto cardíaco en roedores a través de la activación selectiva de la proteína G (Brame et al., 2015). Aunque aún faltan más estudios con este tipo de agonistas sesgados, esto abre un panorama amplio para implementar al sistema apelina/APJ en el tratamiento de la HTA y otras enfermedades cardiovasculares.

3.19. El sistema APLN/APJ en la obesidad

La apelina es una adipocina que se expresa y secreta altamente por el tejido adiposo (Boucher et al., 2005), en este sentido, se ha descrito que la expresión de esta adipocina, así como su concentración sérica se correlacionan positivamente con el índice de masa corporal (Castan-Laurell et al., 2008; Heinonen et al., 2009). En general se considera que los individuos con obesidad presentan concentraciones mayores de apelina total en plasma, y son los individuos con obesidad grado III quienes presentan una mayor concentración sérica (Krist et al., 2013; Schinzari et al., 2017), aunque existen resultados contrarios (Soriguer et al., 2009). Esto se puede deber a que en la obesidad existe una estrecha relación entre la adipogénesis y la angiogénesis en el tejido adiposo. En este sentido, uno de los principales estímulos de la angiogénesis a través del HIF induce la expresión génica de apelina en diferentes modelos (Kunduzova et al., 2008.) Además, la obesidad es definida como una enfermedad inflamatoria de bajo impacto crónica, en donde se encuentran incrementadas algunas citocinas pro-inflamatorias las cuales pueden inducir la expresión de apelina en el tejido adiposo (Daviaud et al. 2006; Han et al., 2008).

3.20. El sistema APLN/APJ en la hipertensión arterial asociada a la obesidad

Un estudio en modelo animal analizó la concentración sérica de apelina y la expresión del sistema APLN/APJ en el tejido adiposo de ratas con HTA asociada a la obesidad (inducida por una dieta rica en grasa). En este estudio encontraron que las ratas con HTA asociada a la obesidad presentaban concentraciones séricas de apelina menores que las ratas con normopeso sin HTA, de igual forma la expresión génica tanto de apelina como su receptor APJ en el tejido adiposo visceral fue menor en las ratas con HTA asociada a la obesidad (Wu et al., 2014).

De forma similar, un estudio que analizó y comparó la expresión génica de *APLN* en el tejido adiposo visceral de mujeres no hipertensas (n=56) e hipertensas (n=32), reportó que las mujeres hipertensas presentaron una expresión génica menor en comparación con las mujeres no hipertensas (Fain et al., 2011). Estos resultados indican la desregulación en la expresión del sistema APLN/APJ en el tejido adiposo y su asociación con el desarrollo de HTA en la obesidad.

4. Planteamiento del problema

La HTA es el *factor de riesgo* más importante para desarrollar enfermedades cardiovasculares, las cuales son la principal causa de muerte en México. En nuestro país la prevalencia de HTA en los adultos es de 31.5 %, por lo que se considera a esta enfermedad un problema de salud pública. Del total de individuos que padecen esta enfermedad, entre el 90 y el 95% de ellos presentan HTA esencial, padecimiento de que se desconoce su etiología. Por lo anterior, se ha considerado que la HTA esencial es una enfermedad compleja en donde diferentes componentes participan en su desarrollo como la edad, el sexo, la predisposición genética y algunas comorbilidades como la obesidad, las dislipidemias y la diabetes. Varios son los paradigmas que tratan de explicar la participación de la obesidad en el desarrollo dentro de ellos, la desregulación en la expresión y secreción de las adipocinas es uno de los más estudiados en los últimos años, debido a que son varias las adipocinas las que participan en la regulación de la presión arterial. Una de ellas es la apelina, una adipocina que puede disminuir la presión arterial al unirse a su receptor (APJ) en las células endoteliales y genera vasodilatación. Debido a ello, varios estudios han propuesto a este sistema como un blanco terapéutico para el tratamiento contra la HTA. Sin embargo, se conoce poco sobre el sistema APLN/APJ en los pacientes con HTA asociada a la obesidad. Por lo que, el presente estudio evaluó y comparó la expresión del sistema ALN/APJ en el tejido adiposo y las concentraciones de las isoformas de apelina en el suero de individuos con HTA y obesidad contra individuos sin HTA con obesidad, para conocer la participación de este sistema en el desarrollo de la HTA asociada a la obesidad.

5. Pregunta de investigación

¿Es diferente la expresión del sistema APLN/APJ y las concentraciones de las isoformas de apelina entre los individuos sin HTA y obesidad grado III contra los individuos con HTA con obesidad grado III?

6. Justificación

La prevalencia de HTA en México es de 42.3% en personas con obesidad. Varios estudios longitudinales han establecido que la obesidad es el principal *factor de riesgo* para desarrollar HTA. En nuestro país, la prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha incrementado en los últimos años. Por lo que conocer los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de la HTA relacionada a la obesidad, permitirán establecer nuevos blancos terapéuticos (sistema APLN/APJ), que puedan ser utilizados para desarrollar nuevos tratamientos antihipertensivos o complementar los ya existentes y poder brindar una mejor calidad de vida a los pacientes.

7. Hipótesis

La expresión del sistema APLN/APJ en el tejido adiposo visceral así como las concentraciones séricas de las isoformas de apelina (apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36), serán mayores en los individuos sin HTA y obesidad grado III al compararlos contra individuos con HTA y obesidad grado III.

8. Objetivo general

Comparar la expresión génica y proteica del sistema APLN/APJ en el tejido adiposo visceral y las concentraciones séricas de las isoformas de apelina (apelina-12, apelina-13, apelina-17, apelina-36) entre el grupo de individuos con obesidad grado III sin HTA contra el grupo de individuos con obesidad grado III y con HTA.

9. Objetivos particulares

- Analizar la expresión de los genes *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo en los individuos con obesidad grado III sin HTA y en individuos con obesidad grado III con HTA.
- Analizar los niveles de proteína de apelina y APJ en el tejido adiposo visceral en los ambos grupos de estudio (individuos con obesidad grado III sin HTA e individuos con obesidad grado III con HTA).
- Determinar la concentración sérica de cada una de las isoformas de apelina (apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36) en ambos grupos de estudio (individuos con obesidad grado III sin HTA e individuos con obesidad grado III con HTA).

10. Diseño metodológico

10.1. Tipo de estudio

Estudio observacional, transversal y comparativo

10.2. Sujetos

Este estudio fue realizado en pacientes de la Clínica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas del Hospital General “Dr. Rubén Leñero” quienes asistieron a esta clínica para la realización de una cirugía bariátrica entre el período de 2014 a 2017. Todos ellos aceptaron participar en este estudio y firmaron una carta de consentimiento informado, la cual se estructuró acorde con las disposiciones de la Secretaría de Salud en materia de investigación en humanos, mismas que establece el Hospital General “Dr. Rubén Leñero”, SSDF (Anexo 4).

Antes de la cirugía a todos los individuos se les realizó una historia clínica completa, que incluyeron los parámetros antropométricos, los valores bioquímicos clínicos y los valores de presión arterial de acuerdo a los lineamientos establecidos por la OMS. El diagnóstico de HTA se realizó siguiendo los criterios establecidos por la OMS y la Asociación Americana del Corazón, y aceptados por la Secretaría de Salud. Lo anterior fue realizado por personal calificado del Hospital General “Dr. Rubén Leñero”. De acuerdo a este diagnóstico los individuos se clasificaron en individuos no hipertensos (**NHT**) e individuos hipertensos (**HT**), los criterios de inclusión, exclusión y eliminación para cada grupo son los siguientes:

10.3. Criterios de inclusión para el grupo de NHT

1. Hombres o mujeres entre los 24 a los 48 años de edad.
2. Presentar obesidad grado III de acuerdo al índice de masa corporal.
3. Ser sometidos a cirugía bariátrica.
4. Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

10.4. Criterios de exclusión para el grupo de NHT

1. Presentar de diabetes mellitus.
2. Presentar dislipidemia sin tratamiento adecuado.
3. Procesos patológicos que condicionen la obesidad como una enfermedad secundaria: Síndrome de Prader Willi, Síndrome de Lawrence Moon, Síndrome de Cushing, etc.
4. Individuos con cardiopatía isquémica.
5. Individuos con trastornos neurológicos: síndrome de Guillian-Barré, porfiria aguda, disautonomía familiar, etc.
6. Individuos con ingesta crónica y activa de alcohol (≥ 3 días por semana).
7. Presentar diagnóstico para cualquier tipo de cáncer.
8. Presentar diagnóstico de VIH.

10.5. Criterios de eliminación para el grupo de NHT

1. Individuos que deseen abandonar el estudio.
2. Que la muestra sea insuficiente o de mala calidad para el estudio experimental.

10.6. Criterios de inclusión para el grupo HT

1. Hombres o mujeres entre 24 y 48 años de edad.
2. Presentar diagnóstico de HTA de acuerdo a los criterios establecidos por JNC 8 (siglas en inglés de Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee) (James y cols., 2004) y por la Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología, los cuales son aceptados por la Secretaría de Salud.
3. Presentar obesidad grado III de acuerdo al índice de masa corporal.
4. Ser sometidos a cirugía bariátrica.
5. Que acepten participar en el estudio y firmen la carta de consentimiento informado.

10.7. Criterios de exclusión para el grupo HT

1. Presentar tratamiento antihipertensivo con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS).
2. Individuos con diagnóstico de HTA secundaria a:
 - Patología Renal: enfermedad renal de origen parenquimatoso, glomerulonefritis aguda, nefritis crónica, enfermedad poliquística, nefropatía diabética, hidronefrosis, enfermedad renovascular, estenosis de la arteria renal, vasculitis intrarrenal, tumores productores de renina, retención primaria de sodio (Síndrome de Liddle).
 - Patología de tipo endócrino: acromegalia, hipotiroidismo e hipertiroidismo sin adecuada sustitución, hipercalcemia, hiperparatiroidismo, trastornos suprarrenales: feocromocitoma, hiperaldosteronismo primario, síndrome de Cushing, tumores cromafines extra-suprarrenales, carcinoide, hormonas exógenas (estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, simpaticomiméticos, eritropoyetina).
 - Insuficiencia cardíaca crónica.
 - Coartación de la aorta
 - Hipertensión pulmonar
 - Ingesta crónica de esteroides
 - Hipertensión portal
3. Presentar diabetes mellitus.
4. Presentar dislipidemia sin tratamiento adecuado.
5. Procesos patológicos que condicionasen la obesidad como una enfermedad secundaria como: síndrome de Prader Willi, síndrome de Lawrence Moon, síndrome de Cushing, etc.
6. Individuos con cardiopatía isquémica.
7. Individuos con trastornos neurológicos: síndrome de Guillian-Barré, porfiria aguda, disautonomía familiar, etc.
8. Individuos con ingesta crónica y activa de alcohol (≥ 3 días por semana).
9. Presentar diagnóstico para cualquier tipo de cáncer.
10. Presentar diagnóstico de VIH.

10.8. Criterios de eliminación para el grupo HT

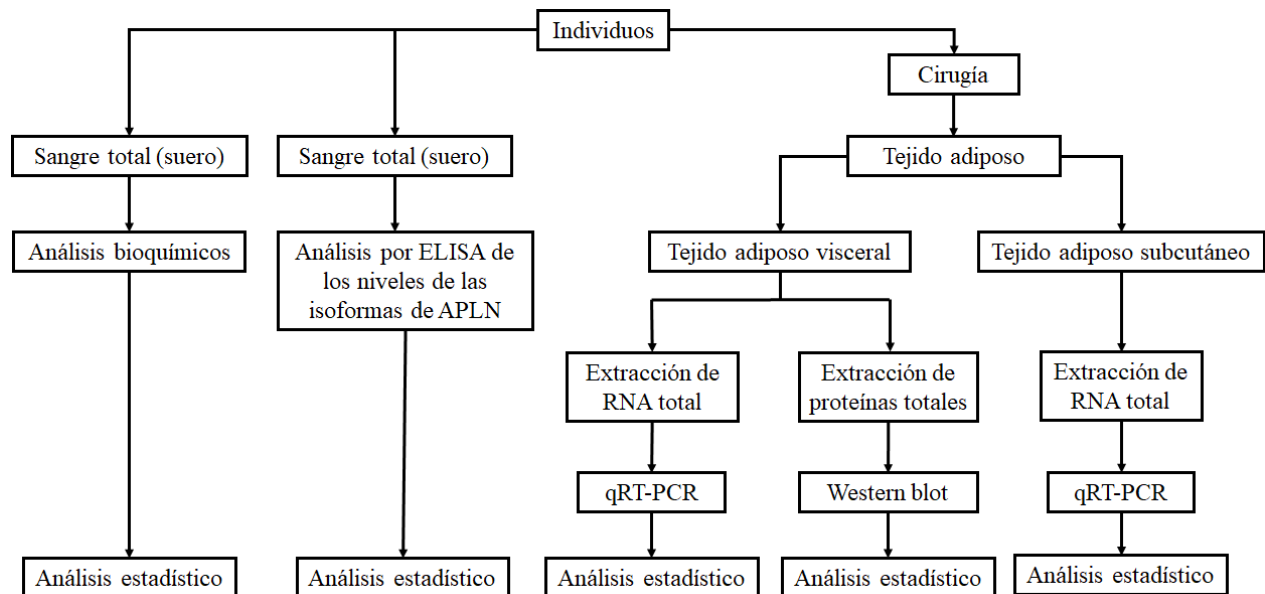
1. Individuos que deseen abandonar el estudio.
2. Que la muestra sea insuficiente o de mala calidad para el estudio experimental.

11. Consideraciones éticas

Los procedimientos empleados en este protocolo tienen su fundamento en las normas éticas vigentes del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y en la Declaración de Helsinki.

Para la realización de este estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Investigación Científica y de la Comisión de Ética en Investigación en Salud del Hospital General “Dr Rubén Leñero” con número de registro 2050101214 y del Comité de Investigación Científica y de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM con número de registro 148/2014.

12. Diagrama metodológico



13. Métodos experimentales

13.1. Medición de la presión arterial

La medición de la presión arterial se realizó utilizando el esfigmomanómetro digital modelo Omron *comford*.

13.2. Medidas antropométricas

En todos los individuos, las mediciones de peso y estatura se realizaron en posición de pie, vestidos con una bata de hospital y sin zapatos, utilizando equipos en buen estado y calibrados. El índice de masa corporal se calculó dividiendo el peso en kilogramos entre la estatura expresada en metros elevada al cuadrado (kg/m^2). Todas las mediciones se realizaron por personal del Hospital General “Dr. Rubén Leñero”.

13.3. Determinación de parámetros bioquímicos

Dos semanas antes de la cirugía, a cada paciente se le tomó una muestra de sangre por la mañana después de un ayuno de 8-12 horas, la cual se utilizó para la cuantificación de glucosa en plasma y de los parámetros lipídicos triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL. El colesterol LDL fue calculado por la fórmula de Friedewald. Todas las mediciones se realizaron en el laboratorio clínico del Hospital General “Dr. Rubén Leñero”.

13.4. Extracción de RNA de tejido adiposo y conversión a cDNA

Durante la cirugía, personal calificado del Hospital General “Dr. Rubén Leñero” realizó la toma de una muestra de tejido adiposo visceral y otra de tejido adiposo subcutáneo (un centímetro cúbico aproximadamente), ambas biopsias se mantuvieron en RNA *later* y a 4°C hasta finalizar la cirugía, después fueron transportadas al laboratorio en frío y fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis. A partir de 20 mg de cada biopsia de tejido adiposo, se realizó la extracción de RNA total utilizando

el *Fassy Tissue RNA Purification Kit* (Norgen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad de RNA fue cuantificada por espectrofotometría (Implen Nanophotometer, München, Germany) (Anexo 1) y su integridad fue evaluada en gel de agarosa al 1.5% (Anexo 2). Un microgramo de RNA de cada biopsia fue tratado con DNasa (Thermo Scientific), para eliminar DNA genómico. Posteriormente, cada muestra de RNA fue convertida a cDNA utilizando los *random primers* y la transcriptasa inversa del kit *RevertAid H minus First Strand* (Thermo Scientific).

13.5. Análisis de la expresión génica por qRT PCR

La expresión del mRNA de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo visceral y del tejido adiposo subcutáneo se determinó por PCR cuantitativa utilizando sondas Taqman en el equipo LightCycler 480 Instrument II (Roche, Basilea, Suiza) (Anexo 3). Los niveles de expresión relativa de *APLN* (Applied Biosystem, HS00936329_m2) y *APLNR* (Applied Biosystem, HS00270873_s1) fueron calculados en el software LightCycler Relative Quantification Analysis por el método matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando como genes de referencia a *HPRT1* (Applied Biosystem, HS02800695_m1) y *GAPDH* (Applied Biosystem, Hs99999903_m1) respectivamente. La eficiencia de todas las sondas fue >1.85 y el error fue <0.02 . Se utilizó un control negativo de amplificación (Reverse transcriptase minus) y un control negativo del templado para cada corrida.

13.6. Extracción de proteína total del tejido adiposo visceral

Se utilizaron entre 300-400 mg de tejido adiposo visceral para la extracción de proteínas totales. El tejido fue disgregado por homogenización (Omni TH, tissue homogenizer) y sonicación (Thermolab) en RIPA frío (Bio Rad, Richmond, CA, USA) con inhibidores de proteasas (Roche). Posteriormente, el homogenizado fue centrifugado (13500rpm/20 min/4°C) y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford (Bio Rad, Richmond, CA, USA), la lectura del ensayo se realizó en un espectrofotómetro a 595nm (iMARK TM, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), y los valores fueron calculados con el software del equipo (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA).

13.7. Cuantificación de las proteínas apelina y APJ por Western blot

Los extractos proteicos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) con dodecilsulfato de sodio y transferidos a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo Transblot turbo fast (Bio Rad, Richmond, CA, USA). Las membranas se incubaron durante 12 horas con los anticuerpos primarios para APELINA (GeneTex, Irvine, CA, USA), APJ (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) y β -actina (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Posteriormente, las membranas fueron lavadas e incubadas durante una hora con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rabano específico para cada proteína. Las proteínas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando ECL durante un minuto (Millipore, Billerica, MA, USA), el cual reacciona con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP, produciendo una señal que fue cuantificada con el software ImageJ. Se utilizó a la proteína β -actina como control de carga.

13.8. Cuantificación de las isoformas de apelina por ELISA

Una hora antes de la cirugía, a cada participante se le realizó la toma de una muestra de sangre total, de donde se obtuvo el suero por centrifugación (3000rpm/10 minutos). Cada muestra de suero se mantuvo a 4°C hasta finalizar la cirugía, después se transportó al laboratorio en frío y fue almacenada a -80°C hasta su análisis. La cuantificación de las isoformas de apelina se realizó por duplicado en el suero de todos los participantes, mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) competitiva utilizando un kit comercial independiente para cada isoforma [apelina-12 (CEA856Hu), apelina-13 (CEB887Hu), apelina-17 (CED065Hu) y apelina-36 (CEB865Hu)] (Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA). La lectura del ensayo se realizó en un lector de microplaca (iMARK TM, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), y se analizó en el software del equipo (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). El rango de detección para el ensayo de apelina-12 es de 63.1–6190.7 pg/mL, para apelina-13 es de 11.8–895.6 pg/mL, para apelina-17 es de 102.8–2120.2 pg/mL y para apelina-36 es de 121.1–762.6 pg/mL. El coeficiente de variación para el intra-ensayo fue <10% y para el inter-ensayo fue <12.0% para todas las isoformas de apelina.

14. Análisis estadístico

Los resultados son presentados en media \pm desviación estándar. Se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov como prueba de normalidad. La correlación entre las variables se realizó mediante la prueba de Spearman. La prueba de Chi-cuadrado se utilizó para comparar variables cualitativas. Para la comparación de variables cuantitativas entre dos grupos se utilizó la prueba paramétrica *t de Student* y para comparar más de dos grupos se utilizó ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey. Se utilizó una regresión logística o una prueba de ANCOVA para ajustar la edad y el IMC, según fuera el caso. Un valor de $p < 0.05$ indica diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y los gráficos en el programa GraphPad Prism 6.

15. Resultados

15.1. Características generales

Se realizó un estudio transversal en pacientes de la Clínica Integral de Cirugía para la Obesidad y Enfermedades Metabólicas del Hospital General “Dr. Rubén Leñero”, en el que se analizaron a 74 individuos con obesidad grado III con un rango de edad de entre 24 a 48 años de edad y quienes en su mayoría pertenecían al sexo femenino (77%). Estos individuos fueron clasificados como: no hipertensos (**NHT**) (n=45) e hipertensos (**HT**) (n=30), siguiendo los criterios previamente mencionados. Todos los individuos del grupo de HT presentan tratamiento farmacológico con antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II) y/o diuréticos.

Los datos antropométricos, bioquímicos y los antecedentes familiares de ambos grupos se presentan y comparan en la tabla 3. En ella, observamos que la edad, los valores de presión arterial, el IMC y la historia familiar de HTA son mayores en el grupo HT en comparación con el grupo NHT ($p < 0.05$). Mientras que el sexo, los valores de glucosa y perfil lipídico, el fumar y los antecedentes familiares de obesidad y diabetes mellitus, no presentan diferencias estadísticamente

significativas entre los grupos ($p > 0.05$). Los análisis posteriores fueron ajustados por la edad y el IMC.

Tabla 3 Características generales de los sujetos con obesidad grado III con y sin HTA

	NHT	HT	P
Datos			
n (75)	45	30	-
Hombres (%)	8 (18)	8 (26)	0.262
Edad (años)	32 ± 6	36 ± 6	0.002
PAS (mmHg)	118 ± 9	142 ± 12	1x10⁻¹⁵
PAD (mmHg)	73 ± 7	91 ± 10	1x10⁻¹²
IMC (Kg/m ²)	43 ± 3	47 ± 7	0.010
Glucosa (mg/dL)	96 ± 9	98 ± 9	0.420
Triglicéridos (mg/dL)	161 ± 59	151 ± 55	0.435
Colesterol (mg/dL)	188 ± 31	176 ± 31	0.116
LDL (mg/dL)	121 ± 32	113 ± 32	0.323
HDL (mg/dL)	38 ± 8	39 ± 9	0.575
Fuman (%)	28 (62)	18 (60)	0.518
Índice tabáquico	1.66 ± 0.61	2.25 ± 0.93	0.588
Historia familiar de HTA (%)	17 (38)	20 (66)	0.013
Historia familiar de obesidad (%)	24 (53)	20 (66)	0.182
Historia familiar de diabetes millitus (%)	20 (44)	13 (43)	0.557

Los datos se muestran en medias y desviación estándar. PAS= presión arterial sistólica; PAD= presión arterial diastólica; IMC= índice de masa corporal; LDL= lipoproteínas de baja densidad; HDL= lipoproteínas de alta densidad. Se realizó la prueba *t de Student* para comparar los grupos.

15.2. Expresión génica

Se sabe que el tejido adiposo localizado en la región central se asocia fuertemente con el desarrollo de la HTA, sin embargo se ha descrito que estos tejidos tienen diferentes perfiles de expresión génica (Krist et al., 2013). Por ello, nosotros evaluamos la expresión de mRNA de los genes *APLN* y *APLNR* tanto al tejido adiposo visceral como al tejido adiposo subcutáneo.

Inicialmente comparamos la expresión del mRNA de los genes de apelina (*APLN*) y APJ (*APLNR*) entre el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo en todos los individuos (n=75). Nuestros resultados indican que la expresión de mRNA de *APLN* es similar tanto en el tejido adiposo visceral como en el tejido adiposo subcutáneo ($p>0.05$) (Fig. 2A). Mientras que la expresión génica de *APLNR* es menor en el tejido adiposo visceral en comparación con el tejido adiposo subcutáneo ($p=0.001$) (Fig. 2B).

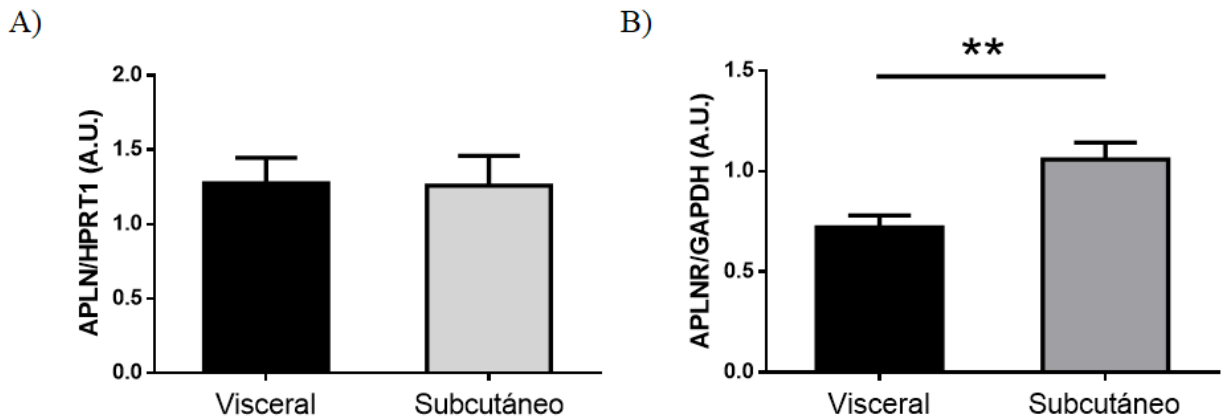


Figura 2. Expresión de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo. A) Comparación de la expresión de *APLN* entre el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo. B) Comparación de la expresión de *APLNR* entre el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo. Se realizó la prueba *U de Man-Whitney* para comparar los grupos (n=75). ** $p<0.001$.

Algunos estudios han descrito que la expresión de mRNA de *APLN* puede inducir la expresión de *APLNR* en el tejido adiposo (Krist et al., 2013), por lo que nosotros realizamos un análisis de correlación entre la expresión del mRNA de *APLN* y la de *APLNR* en ambos depósitos de grasa.

Nuestros resultados muestran que la expresión de *APLN* se correlaciona positivamente con la expresión de *APLNR* en el tejido adiposo subcutáneo ($r=0.431$; $p=0.011$) (Fig.3B), pero no en el tejido adiposo visceral ($r=-0.088$; $p=0.457$) (Fig. 3A).

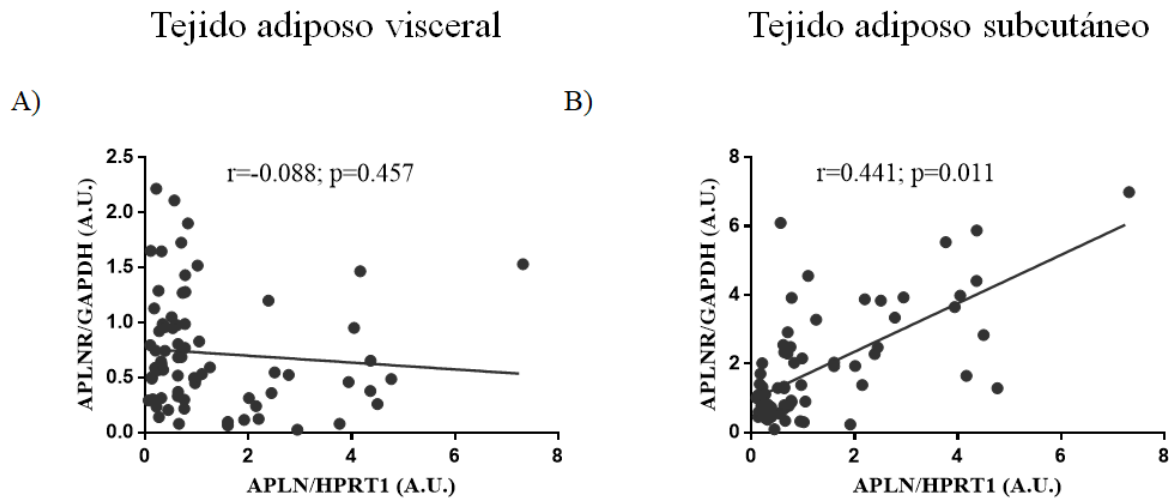


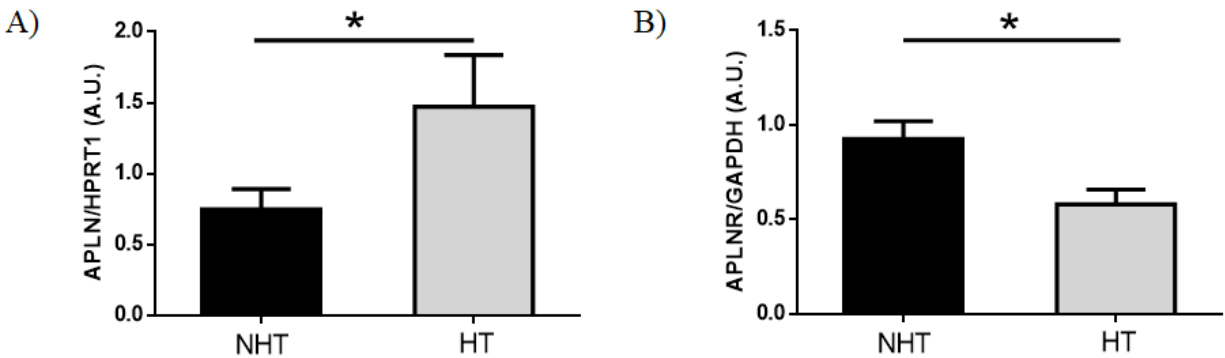
Figura 3 Correlación entre expresión génica de *APLN* y *APLNR*. A) Correlación en el tejido adiposo visceral (n=75). B) Correlación en el tejido adiposo subcutáneo (n=75).

Posteriormente separamos a las muestras entre el grupo de no hipertensos (NHT) y el grupo de hipertensos (HT), y comparamos la expresión del mRNA de *APLN* y *APLNR* en ambos depósitos de grasa.

Nuestros resultados muestran una mayor expresión de mRNA de *APLN* en el grupo de HT al compararlo contra el grupo NHT en el tejido adiposo visceral ($p=0.045$) (fig. 4A). Esta diferencia no se observó en el tejido adiposo subcutáneo ($p>0.05$) (fig. 4C).

De forma contraria, observamos que la expresión de *APLNR* fue menor en el grupo de HT al compararlo con el grupo de NHT ($p=0.010$) en el tejido adiposo visceral (fig. 4B). Mientras que esta diferencia no se observó en el tejido adiposo subcutáneo ($p>0.05$) (fig. 4D).

Tejido adiposo visceral



Tejido adiposo subcutáneo

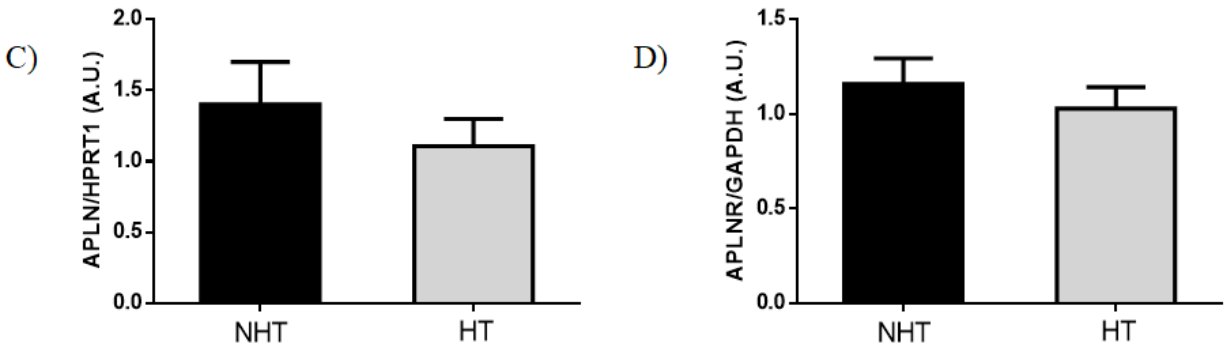


Figura 4 Comparación de la expresión de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo visceral y subcutáneo. A) y B) Comparación de la expresión de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo visceral entre NHT (n=45) vs HT (n=30). C) y D) Comparación de la expresión de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo subcutáneo entre NHT (n=45) e HT (n=30). Se realizó la prueba *T de Student* (*APLNR*) o *U de Man-Whitney* (*APLN*) para comparar entre los grupos. NHT: No hipertensos; HT: Hipertensos. *p<0.05, **p<0.001.

15.3. Expresión proteica de apelina y APJ en el tejido adiposo visceral

Posteriormente, realizamos la cuantificación y comparación de apelina y APJ entre los grupos (NHT vs HT). Nuestros resultados revelan que no hay diferencia en la concentración de apelina entre los grupos ($p > 0.05$) (fig. 5). Mientras que encontramos una clara disminución en la concentración de APJ en el grupo HT al compararlos contra los NHT ($p = 0.005$) (fig. 6).

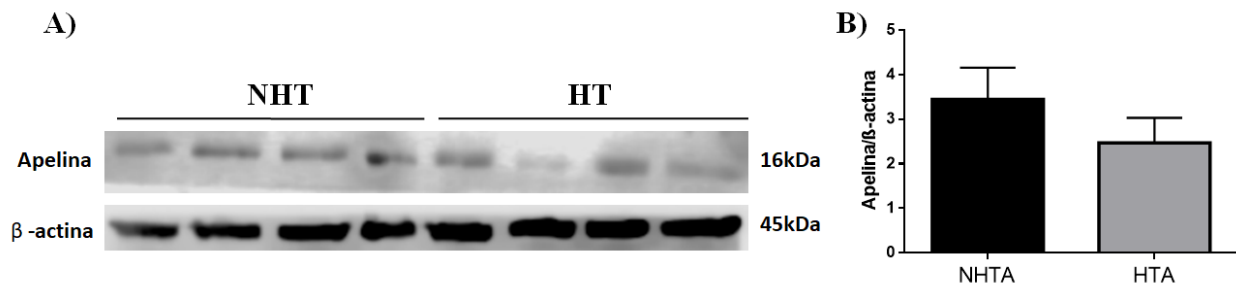


Figura 5 Expresión de apelina en tejido adiposo visceral A) Inmunoblot de apelina de extracto de proteínas de tejido adiposo visceral B) Comparación de la cantidad de apelina entre NHT (n=10) vs HT (n=10). Se realizó la prueba *T de Student* para comparar entre los grupos. NHT; no hipertensión arterial HT; hipertensión arterial.

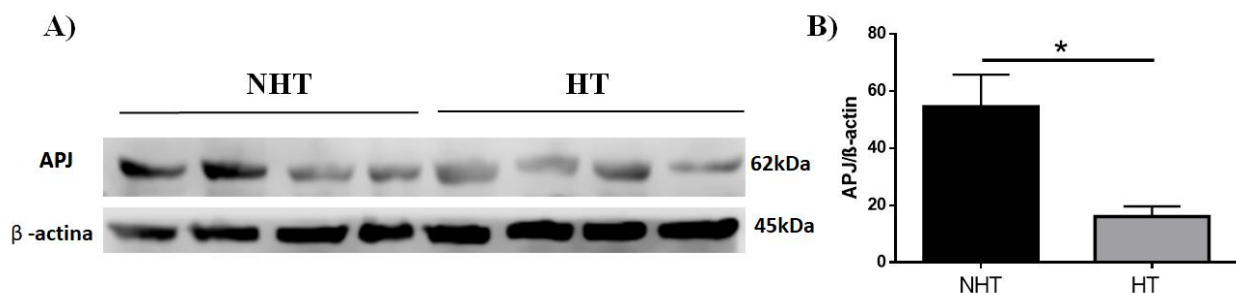


Figura 6 Expresión de APJ en tejido adiposo visceral. A) Inmunoblot para APJ del extracto de proteínas de tejido adiposo visceral B) Comparación de la cantidad de APJ entre NHT (n=10) vs HT (n=10). Se realizó la prueba *T de Student* para comparar entre los grupos. El análisis fue ajustado por IMC. NHT; no hipertensión arterial HT; hipertensión arterial. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

15.4. Concentraciones séricas de las isoformas de apelina

Por otro lado, cuantificamos y comparamos la concentración sérica de las isoformas de apelina (apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36) entre ambos grupos (NHT vs HT). Nuestro análisis muestra que no existe diferencia significativa entre los grupos en ninguna de las isoformas de apelina-12 $p=0.144$ (fig.7A), apelina-13 $p=0.212$ (fig.7B), apelina-17 $p=0.0501$ (fig.7C) y apelina-36 $p=0.778$ (fig. 7D). De forma general, observamos que las concentraciones de todas las isoformas de apelina son mayores en el grupo NHT con respecto al grupo HT, como lo descrito anteriormente (Liakos et al., 2016).

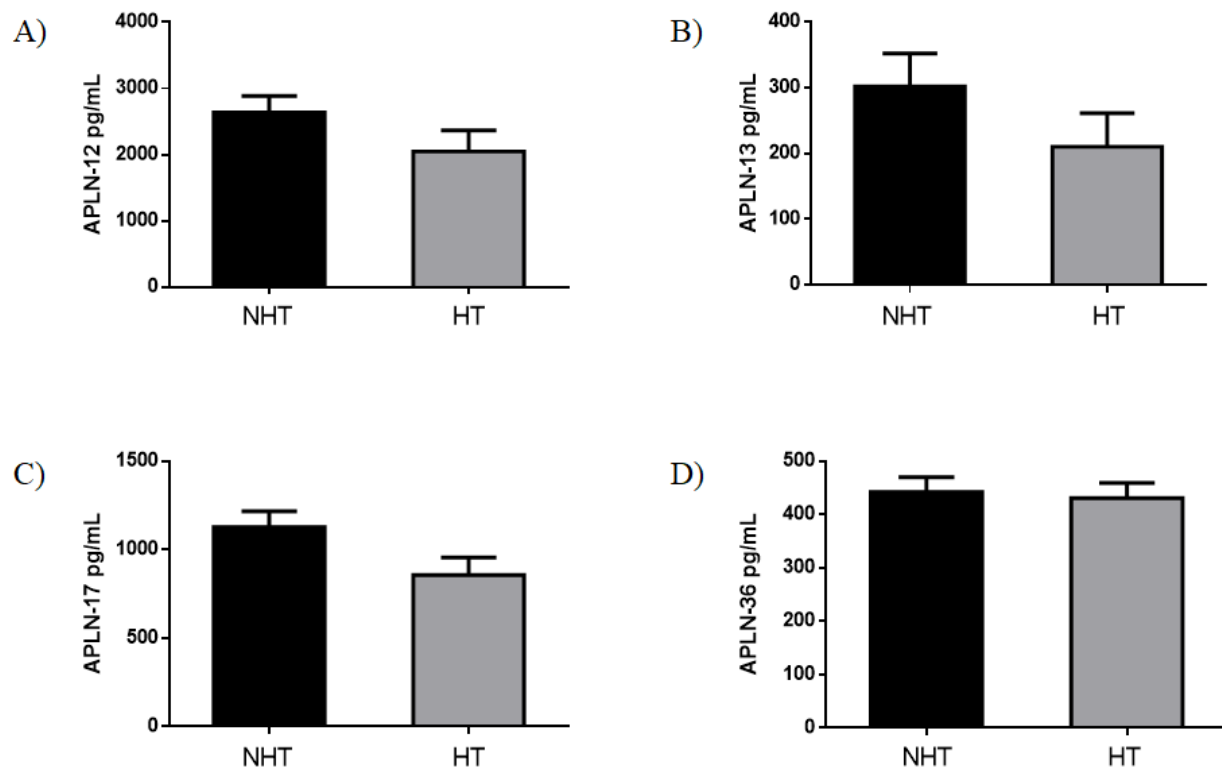


Figura 7 Comparación de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina. A) Comparación de apelina-12 entre NHT vs HT B) Comparación de apelina-13 entre NHT vs HT C) Comparación de apelina-17 entre NHT vs HT D) Comparación de apelina-36 entre NHT vs HT. NHT; no hipertensión arterial (n=33). HT; hipertensión arterial (n=26).

Posteriormente realizamos un análisis de correlación entre las concentraciones de las isoformas de apelina y los valores de presión arterial sistólica (PAS) y presión arterial diastólica (PAD), pero solo en los individuos del grupo de NHT, los cuales no presentan tratamiento farmacológico contra la HTA.

Nuestros resultados indican que existe una correlación positiva entre la PAS y la concentración de apelina-17 $r=0.323$; $p=0.035$, pero no con las otras isoformas de apelina (ver tabla 4). Mientras que nuestros resultados indican que no existe una correlación entre la presión arterial diastólica (PAS) con alguna de las concentraciones de las isoformas de apelina (ver tabla 4).

Tabla 4 Correlación entre la presión arterial y las concentraciones de las isoformas de apelina en el grupo de NHT

Presión arterial	Apelina-12	Apelina-13	Apelina-17	Apelina-36
PAS (mmHg)	r=0.01; p=0.44	r=0.041; p=0.330	r=0.32 ; p=0.03	r=0.01 ; p=0.57
PAD (mmHg)	r=0.01 ; p=0.99	r=0.01 ; p=0.95	r=0.01 ; p=0.47	r=0.01 ; p=0.84

PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica. NHT: no hipertensos (n=33).

Como lo mencionamos anteriormente, la presión arterial se clasifica en presión normal óptima, presión normal, presión normal elevada e hipertensión grado 1 y 2 (Mancia et al., 2013) ver tabla 1, sin embargo recientemente una nueva clasificación fue establecida en: normal, elevada e hipertensión etapa 1 o etapa 2 (Whelton et al., 2017), modificando los valores de presión arterial en cada categoría. Con base en esto, nosotros estratificamos al grupo de NHT en individuos con presión normal (NBP) e individuos con presión normal elevada (EBP) y comparamos las concentraciones de las isoformas de apelina entre los tres grupos (NBP vs EBP vs HT).

Nuestro resultados indican que las concentraciones de las isoformas de apelina-12, apelina-13 y apelina-36 no son estadísticamente significativas entre los otros grupos ($p > 0.05$) (fig. 8). Mientras que se encontró que la isoforma de apelina-17 se encuentra elevada en el grupo de individuos con EBP al compararlo con el grupo de NBP ($p = 0.049$) y contra el grupo de HT ($p = 0.001$) (fig. 8C). Las otras isoformas de apelina no mostraron diferencias ($p > 0.05$)

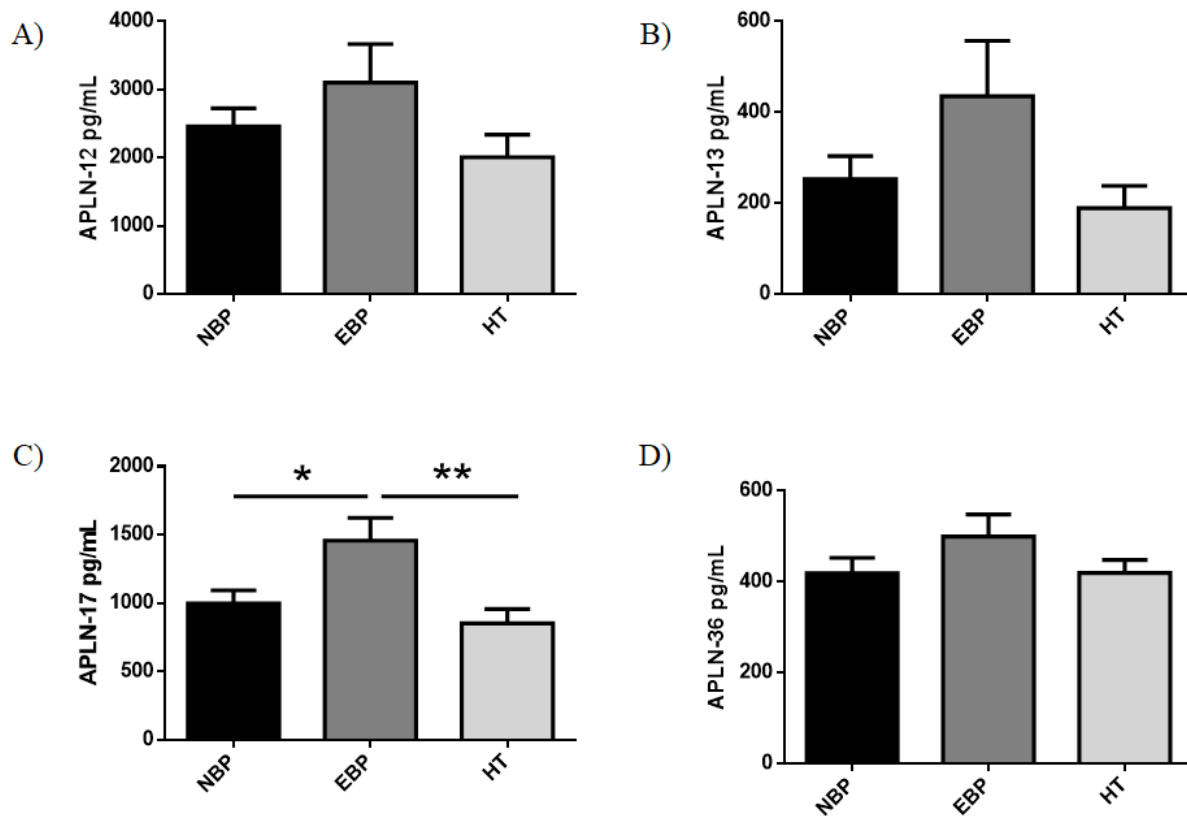


Figura 8 Comparación de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina. A) Comparación de apelina-12 entre NBP vs EBP vs HT B) Comparación de apelina-13 entre NBP vs EBP vs HT C) Comparación de apelina-17 entre NBP vs EBP vs HT D) Comparación de apelina-36 entre NBP vs HBP vs HT. Se realizó la prueba ANOVA de una vía con la prueba post hoc de *Tukey* para comparar a los grupos. NBP; presión normal (n=23); EBP: presión normal elevada (n=10); HT; hipertensión arterial (n=26). *p<0.05, **p<0.001.

16. Discusión

La HTA esencial se define como una enfermedad compleja debido a que son varios los componentes que participan en su desarrollo. Sin embargo, varios estudios longitudinales han establecido que la obesidad y en particular la obesidad central es el principal *factor de riesgo* relacionado con el desarrollo de esta enfermedad.

En la actualidad, son varios los paradigmas que han tratado de explicar esta asociación y dentro de ellos, uno que ha sido explorado recientemente, es la desregulación de la expresión y secreción de las adipocinas que participan directamente en la regulación de la presión arterial. Entre ellas se encuentra la apelina, adipocina que se ha descrito que puede disminuir la presión arterial al unirse a su receptor APJ. Por lo que se ha establecido al sistema APLN/APJ como un blanco terapéutico contra la HTA. Sin embargo, varios autores han descrito que la apelina se sobre expresa en los individuos que presentan obesidad, enfermedad muy relacionada con el desarrollo de la HTA. Por ello, a nosotros nos interesó conocer si la desregulación en el sistema APLN/APJ se encuentra relacionado con la presencia de HTA en individuos con obesidad.

Por lo anterior, en este estudio nos enfocamos en analizar la expresión del sistema APLN/APJ de forma local en el tejido adiposo y de forma sistémica en el suero, para conocer si la desregulación de este sistema en individuos con obesidad se relacionaba con la HTA.

Debido a que son varios componentes los que participan en el desarrollo de la HTA, nosotros determinamos rangos tanto de IMC (obesidad grado III), en la edad (24 a 48 años) y en los parámetros bioquímicos (glucosa y perfil lipídico), que permitieran comparar grupos homogéneos. Lo anterior, permitió comparar grupos similares, en los parámetros bioquímicos y en la frecuencia del sexo. Sin embargo, encontramos diferencias en el IMC, la edad y en la historia familiar de HTA entre los grupos (Tabla 2). Debido a que la edad y el IMC son componente que participan en el desarrollo de esta enfermedad todos nuestros análisis fueron ajustados estadísticamente por estas variables.

16.1. Expresión génica de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo

La apelina es una adipocina que se expresa principalmente en el tejido adiposo tanto a nivel de mRNA como de proteína (Boucher et al., 2005), mientras que su receptor APJ se expresa en diferentes tejidos (pulmón, tejido adiposo y células endoteliales).

Por su parte, el tejido adiposo se clasifica por su localización en tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo. En este sentido, varios estudios han determinado que existe una expresión de mRNA diferencial entre estos depósitos de grasa. Sin embargo, este es el primer estudio que compara la expresión de mRNA de *APLN* y *APLNR* entre el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo de individuos con obesidad grado III.

Nuestros resultados demostraron que la expresión de *APLN* es indistinta entre ambos depósitos de grasa (Fig. 2A), lo cual se puede deber a la participación que tiene apelina en la adipogénesis (Boucher et al., 2005) y la angiogénesis del tejido adiposo (Kundazova et al., 2008). Sin embargo, es de llamar la atención que la expresión de mRNA de *APLNR* es menor en el tejido adiposo visceral en comparación con el tejido adiposo subcutáneo (Fig. 2B). Esto se puede deber a las funciones diferenciales que tiene el receptor de apelina en ambos tejidos (las cuales aún no se han descrito específicamente) o al microambiente que los circunda. En este sentido, se sabe que en el tejido adiposo visceral, los adipocitos tienden a sufrir hipertrofia y que las condiciones de inflamación y estrés oxidativo pueden contribuir a la supresión de la expresión génica de *APLNR* (Than et al., 2014).

Nuestros resultados también demostraron que existe una correlación positiva entre la expresión génica de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo subcutáneo (fig.3B), pero no en el tejido adiposo visceral (fig. 3A). En este sentido, estudios previos han revelado que apelina al unirse a su receptor APJ activa la vía de señalización de AMPK, lo que lleva a la activación del factor Krüppel-like 2 (KLF2), un factor de transcripción con unión directa al DNA (Gracia et al., 2010) que induce la expresión génica de *APLNR* (McClean et al., 2012). Nuestros resultados por lo tanto, sugieren que la inducción de la expresión génica del receptor de apelina por parte de apelina es eficiente en el tejido adiposo subcutáneo, pero no así en el tejido adiposo visceral.

Por otro lado, en la obesidad el crecimiento descontrolado del tejido adiposo induce hiperplasia e hipertrofia de este tejido, siendo mayor la hiperplasia en el tejido adiposo subcutáneo y mayor la hipertrofia en el tejido adiposo visceral. En este sentido, estudios en líneas celulares y cultivos primarios han demostrado que el factor KLF2 es sobre-expresado en pre-adipocitos pero no en adipocitos maduros (Banerjee et al., 2003). El tejido adiposo visceral está formado principalmente por adipocitos maduros hipertróficos, los cuales podrían expresar menos el factor KLF2 y con ello explicar la disminución de la expresión de mRNA de *APLNR* en este tejido, sin embargo se debe investigar más al respecto.

16.2. Comparación de mRNA de *APLN* y *APLNR* entre NHT contra HT

Posteriormente, realizamos la comparación de la expresión de los genes *APLN* y *APLNR* entre el grupo NHT contra el grupo HT tanto en el tejido adiposo visceral y el tejido adiposo subcutáneo.

Nuestros resultados muestran que la expresión de *APLN* en el tejido adiposo subcutáneo no muestran diferencias entre el grupo de NHT contra el grupo de HT (fig. 4). Sin embargo, encontramos que la expresión de mRNA de *APLN* es mayor en tejido adiposo visceral del grupo de HT en comparación con el grupo de NHT (fig. 4). Lo que sugiere que el microambiente presente en el tejido adiposo visceral puede estar participando en el aumento de la expresión génica de *APLN* en este tejido. Se ha descrito que la obesidad genera que el tejido adiposo visceral presente un microambiente rico en citocinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS), hipoxia e hipertrofia, lo que puede provocar una desregulación en la expresión génica y la secreción de las adipocinas por parte de este tejido (Than et al 2014). En este sentido, estudios previos han demostrado que la inflamación y en particular, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), induce la expresión de *APLN* en el tejido adiposo de humano y ratón a través de la activación de la vía de STAT3 (Daviaud et al., 2006). Aunado a esto, se sabe que el gen de *APLN* presenta un sitio de unión para el factor inducible por hipoxia (HIF), el cual en presencia de hipoxia induce la expresión de *APLN* en el tejido adiposo humano (Geiger et al., 2011). Además, se ha descrito que la obesidad genera cambios epigenéticos, los cuales regulan la expresión génica sin modificar la secuencia de DNA. Uno de ellos, es la metilación del DNA en regiones ricas en CpG, se ha reportado que ciertos individuos nativos de tierras altas y que viven en condiciones de bajo oxígeno (hipoxia), presentan

un menor grado de metilación en la región promotora de *APLN* lo que se ha asociado con el incremento en su expresión génica (Mishra et al, 2015). En conjunto, lo anterior podría explicar el incremento en la expresión de *APLN* en el tejido adiposo visceral que observamos en el grupo de HT al compararlo con el grupo NHT.

Sin embargo, cuando realizamos el análisis a nivel de proteína no encontramos diferencias en el tejido adiposo visceral (fig. 5), estos resultados sugieren que la diferencia encontrada en la expresión génica no repercute en la concentración de proteína en el tejido adiposo visceral, lo que podría deberse a mecanismos de regulación pos-transcripcionales (miRNAs, RNAsas, etc), aunque estos resultados deben ser validados.

Por otro lado, evaluamos la expresión de *APLNR* en ambos tejidos adiposos (visceral y subcutáneo). En donde, de igual forma no encontramos cambios en la expresión génica de *APLNR* en el tejido adiposo subcutáneo (fig.4). Sin embargo, encontramos que la expresión de *APLNR* en el tejido adiposo visceral es menor en el grupo de HT al compararlo contra el grupo de NHT (fig. 4), algo que no había sido reportado hasta ahora. Diversos estudios han sugerido que el estrés oxidativo puede participar en la disminución de la expresión génica de *APLNR* en adipocitos maduros (Than et al., 2014).

De forma interesante, encontramos que al realizar la cuantificación a nivel de proteína el receptor de apelina APJ también se encontraba disminuido en el tejido adiposo visceral del grupo de HT en comparación con los NHT (fig. 6). Por lo que este sugerimos que la disminución en la expresión de APJ en el tejido adiposo visceral se asocia con la presencia de HTA en individuos con obesidad grado III. Algunos estudios han reportado que el estrés oxidativo puede participar en la disminución de la expresión de APJ (Than et al., 2014).

Por otra parte, algunos estudios han reportado la importancia del sistema *APLN/APJ* en el proceso de adipogénesis (Boucher et al., 2005) y angiogénesis en el tejido adiposo (Kundozova et al., 2008). Inclusive, un estudio reciente reportó que el receptor de apelina APJ se expresa fuertemente en las células endoteliales del tejido adiposo (Hwangbo et al., 2017). Se sabe que la correcta angiogénesis es importante para el mantenimiento y funcionamiento del tejido adiposo y que una alteración en

estos procesos podría llevar a un proceso fibrosis. Varios estudios han asociado a la fibrosis presente en el tejido adiposo con las comorbilidades relacionadas con la obesidad. En este sentido, proponemos estudiar la participación del sistema APLN/APJ en el desarrollo de fibrosis en el tejido adiposo visceral y su repercusión en otras patologías como diabetes, resistencia a la insulina, cáncer entre otras.

Diferentes estudios han propuesto al sistema APLN/APJ como un blanco terapéutico contra la HTA (Gerbier et al., 2016), por lo que se han diseñado análogos de apelina en modelos de HTA (Brame et al., 2015; Gerbier et al., 2016). Sin embargo, en este sentido poco se ha estudiado sobre el receptor APJ, nuestros resultados sugieren la participación del receptor APJ en el desarrollo de la HTA en individuos con obesidad. Por lo que proponemos, estudiar más a fondo la participación del receptor APJ en el desarrollo de la HTA, lo que permitirá diseñar nuevos tratamientos antihipertensivos o complementar los ya existentes y con ello brindar una mejor calidad de vida a los pacientes, en particular aquellos que individuos con obesidad quienes en su mayoría presentan resistencia a los tratamientos antihipertensivos.

16.3. Concentración de las isoformas de apelina

Varios estudios han demostrado que las isoformas de apelina (apelina-12, apelina-13 y apelina-17) pueden disminuir la presión arterial mediante la activación de la sintasa de óxido nítrico (eNOS) y la generación de vasodilatación (Tatemoto et al., 2001). Algunos estudios posteriores asociaron la disminución en la concentración sérica de apelina-12 (la adipocina que presenta el mayor efecto hipotensor) con la presencia de HTA (Zhu et a., 2013). Sin embargo, ningún estudio ha evaluado las concentraciones séricas de las otras isoformas de apelina (apelina-13, apelina-17 y apelina-13) y su asociación con la presencia de HTA en individuos con obesidad.

Debido a lo anterior, nuestro estudio es el primero que cuantifica y compara la concentración de las isoformas de apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36 entre individuos con HTA (HT) y obesidad y los compara contra individuos sin HTA pero con obesidad (NHT).

Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de ninguna de las isoformas de apelina entre el grupo de NHT contra el de HT (Fig. 7). Sin embargo, observamos que el grupo de NHT presentaba concentraciones ligeramente mayores de todas las isoformas de apelina, en particular en la isoforma de apelina-17 (Fig. 7C). Estos resultados aunque poco concluyentes son semejantes a lo reportado en diferentes poblaciones en estudio (Zhu et al., 2013; Liakos et al., 2015). Sin embargo, al realizar la prueba de correlación entre las isoforma de apelina y los valores de presión arterial sistólica y diastólica en el grupo de NHT, encontramos, de forma contraria a lo esperado, una correlación positiva entre la isoforma de apelina-17 y los valores de presión arterial diastólica (ver tabla 4). Este resultado indica que a mayor concentración sérica de la isoforma de apelina-17 hay un aumento en los valores de la presión arterial diastólica en los individuos con obesidad y NHT. Estudios previos ya habían sugerido que apelina podría incrementar la presión arterial al estimular la vasoconstricción de las células de musculo liso en modelos celulares (Hashimoto et al., 2006) y en modelos animales (Kagiyama et al., 2005).

La clasificación de HTA se establece de acuerdo a los valores de presión arterial sistólica y diastólica (Mancia et al., 2013). Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva clasificación por parte del panel miembros designados para el Octavo Comité Nacional Conjunto (JNC 8) (James et al., 2014) y por los miembros del equipo de trabajo 2013 ESH / ESC de las Guías de la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) y de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) (Whelton et al., 2017). En esta nueva clasificación los individuos clasificados anteriormente como individuos con presión arterial elevada, ahora son clasificados como pacientes con HTA grado I. Debido a esto, nosotros decidimos separar a nuestro grupo de NHT en individuos con presión arterial normal (NBP) e individuos con presión arterial elevada (EBP), los cuales pertenecerían al grupo de hipertensos en la nueva clasificación (Whelton et al., 2017), pero sin tratamiento farmacológico.

Nuestros resultados revelaron, que el grupo de EBP presento una concentración mayor de apelina-17 en comparación con el grupo de individuos NBP (ver fig. 8). Este resultado sugiere que el incremento de apelina-17 se asocia con el aumento de la presión arterial. Anteriormente, ya se había reportado que apelina podía incrementar los valores de presión arterial (Hashimoto et al., 2006; Kagiyama et al., 2005), sin embargo este es el primer estudio que asocia a la isoforma de

apelina-17 con la presencia de HTA. Aunque se ha reportado que apelina-17 puede inducir la internalización del receptor APJ, lo que podría impedir que otras isoformas se unan a él y ejerzan su función. Esto es debido a que los receptores acoplados a proteínas G, como el receptor APJ, pueden volverse menos sensibles cuando son estimulados constantemente (fenómeno denominado desensibilización) y más sensibles cuando no han sido estimulados (Black et al., 2016). La endocitosis del receptor acoplado a proteína G es un mecanismo de desensibilización y es mediado por β -arrestina y las cinasas de receptores acoplados a proteína G (GRK). Los estudios *in vitro* en una línea celular de hámster chino (CHO-K1) demostraron que el tratamiento con el péptido de apelina-17 induce la endocitosis del receptor APJ mediado por β -arrestina (El Messari et al., 2004). Con respecto a esto y a nuestros resultados, nosotros sugerimos que la concentración elevada de apelina-17 en el grupo EBP podría tratarse de un mecanismo compensatorio que intenta disminuir la presión arterial por vías independientes a las proteínas G, sin embargo, esto podría contribuir a la desensibilización este receptor APJ y asociarse con la presencia de HTA en los individuos con obesidad.

Por otro lado, también observamos que el grupo de EBP presenta concentraciones más elevadas de apelina-17 incluso que el grupo de individuos con HTA (fig.8). Lo anterior, se puede deber al tratamiento antihipertensivo, debido a que se ha reportado que algunos fármacos pueden disminuir las concentraciones séricas de apelina (Sckocylas et al., 2016). Además, se ha descrito que algunos fármacos antihipertensivos de la familia de los antagonistas de los receptores de angiotensina II (losartán) pueden disminuir el estrés oxidativo (Pan et al., 2015), lo cual podría mejorar el microambiente del tejido adiposo y evitar la sobreexpresión del gen *APLN* y con ello disminuir la concentración sérica de todas las isoformas de apelina (incluyendo apelina-17).

Con base en nuestros resultados nosotros proponemos que apelina-17 podría ser un marcador temprano de HTA, sin embargo se necesitan hacer más estudios para confirmar nuestros resultados.

17. Conclusiones

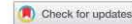
- La expresión génica de apelina (*APLN*) es similar tanto en el tejido adiposo visceral como en el subcutáneo, sin embargo la expresión génica del receptor de apelina (*APLNR*) es menor en el tejido adiposo visceral en comparación con el tejido adiposo subcutáneo.
- Existe una correlación positiva entre la expresión de *APLN* y *APLNR* en el tejido adiposo subcutáneo, pero no en el tejido adiposo visceral.
- Tanto en la expresión génica como la expresión proteica del receptor de apelina (APJ) es menor en el grupo de HT en comparación con el grupo de NHT. Por lo que este es el primer trabajo que reporta que la disminución de la expresión génica y proteica del receptor APJ en el tejido adiposo visceral se asocia con la presencia de HTA en individuos con obesidad.
- La expresión génica pero no proteica de apelina es mayor en el grupo de HT en comparación con el grupo de NHT.
- Las concentraciones séricas de apelina-12, apelina-13, apelina-17 y apelina-36 son similares entre los grupos (NHT vs HT). Sin embargo, existe una correlación positiva entre apelina-17 con los valores de presión arterial sistólica, pero no con los de presión arterial diastólica. Las isoformas de apelina-12, apelina-13 y apelina-36 no presentaron ninguna correlación con los valores de presión arterial.
- La concentración sérica de apelina-17 es mayor en el grupo de individuos EBP que en el grupo de NBP. Por lo que, este es el primer estudio en sugerir que el aumento en la concentración sérica de apelina-17 puede ser un marcador temprano de HTA en los individuos con obesidad.
- De igual forma la concentración sérica de apelina-17 fue mayor en el grupo de individuos EBP en comparación con el grupo de individuos HT.

18. Perspectivas

- Realizar un estudio enfocado en comparar la concentración de la isoforma de apelina-17 entre grupos de NHT vs HT que incluyan individuos con normopeso y sobrepeso, para conocer si esta isoforma puede ser utilizada como un marcador de HTA.
- Determinar por inmunofluorescencia la localización del receptor APJ y de β -arrestina en el tejido adiposo visceral, para conocer si la endocitosis es uno de los mecanismos que puede explicar la disminución del receptor APJ en el tejido adiposo visceral.
- Evaluar el grado de metilación en la región promotora de *APLN*, para conocer si esta modificación epigenética se relaciona con la diferencia encontrada en la expresión génica de apelina en el tejido adiposo visceral.

19. Artículo

CLINICAL AND EXPERIMENTAL HYPERTENSION
<https://doi.org/10.1080/10641963.2018.1462374>



Serum concentrations of apelin-17 isoform vary in accordance to blood pressure categories in individuals with obesity class 3

Luis Javier Cano Martínez^a, Ramón Mauricio Coral Vázquez^{b,c}, Juan Pablo Méndez^{a,d}, Silvia Trejo^e, Juan Carlos Pérez Razo^f, and Patricia Canto^{a,d}

^aObesity Research Unit, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, México City, México; ^bSection of Postgraduate Studies and Research, Higher School of Medicine, National Polytechnic Institute, México City, México; ^cSubdirection of Teaching and Research, National Medical Center "20 de November", Institute of Security and Social Services of State Workers, México City, México; ^dObesity Clinic, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", México City, México; ^eIntegral Clinic of Surgery for Obesity and Metabolic Diseases, General Hospital "Dr. Rubén Leñero", CDMX, México City, México; ^fDivision of Genomic Medicine, Subdirection of Teaching and Research, National Medical Center "20 de November", Institute of Security and Social Services of State Workers, México City, México

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to investigate if serum concentrations of apelin-36, apelin-17, apelin-13 or apelin-12 were different in obesity class 3 individuals with hypertension, when compared to those without hypertension (normal or high-normal).

Subjects and Methods: Twenty six individuals with obesity class 3-related hypertension and thirty three individuals without hypertension, who were divided in individuals with normal (n = 23) or with high-normal (n = 10) blood pressure (BP) were analyzed. All individuals presented obesity class 3, without diabetes mellitus. Measurements of all apelin isoforms were performed using enzyme-linked immunosorbent assay kits. Analysis of differences between groups of Apelin isoform concentrations was performed by a One-way ANOVA, with a Tukey test post hoc.

Results: The individuals of the hypertensive group presented a slightly lower serum concentration of all apelin isoforms, but these differences were not statistically significant. These results were more evident when the group of patients without hypertension were divided based in normal and high-normal BP, observing that apelin-17 isoform were higher in individuals with high-normal BP in comparison to subjects with normal BP (P = 0.018); concentrations were also higher when compared to subjects with hypertension (P = 0.004).

Conclusions: To our knowledge, this is the first study regarding the differences of apelin-17 isoform concentrations in individuals pertaining to different categories of BP, who presented obesity class 3. The group of patients that presented hypertension showed a lower concentration of all isoforms. This observation could be due to the fact that these patients were taking antihypertensive medication.

ARTICLE HISTORY

Received 1 February 2018
Revised 12 March 2018
Accepted 17 March 2018

KEYWORDS

Apelin isoforms; normal BP; high normal BP; hypertension; obesity class 3

Introduction

Hypertension is a main public health problem, which according to a global study will affect 1.56 billion adults by the year 2025 (1). Likewise, obesity has reached epidemic proportions worldwide; in México, the last National Survey demonstrated that the prevalence of the obesity has jumped from 21.5% in 1993, to 33.3% in 2016 (2). It has been established, for many years, that obesity increases the risk of developing hypertension. A direct linear relationship has been documented between the magnitude of weight gain and BP increases (3). Even a moderate gain in weight is associated with an increased risk of developing hypertension (4,5). A collaborative analysis of several prospective studies showed that a higher body mass index (BMI) is associated with several comorbidities, including hypertension (6). These phenomena could be secondary to the fact that visceral adipose tissue is critical for the production and pathological secretion of

adipokines, which could play a role in the development of obesity-related hypertension (7); one of these adipokines is apelin.

Apelin is an endogenous peptide that acts via the APJ G protein-coupled receptor (8). Apelin encodes for a 77 residue pre-pro-peptide and the apelin propeptide contains several proteolytic cleavage sites, which yield carboxy-terminal peptides including apelin-36, apelin-17, apelin-13, apelin-12 and the modified (Pyr¹) apelin-13 (8,9). The heart and the adipose tissue are the main sources of plasma apelin in humans (10,11). Studies in animals suggest that apelin is a powerful inotrope (12) and can act on peripheral vascular tissue as a vasodilator (13), or a vasoconstrictor (14,15). In humans, it has been described that patients with heart failure have lower plasma concentrations of apelin when compared to normal controls (16); moreover, apelin-13 is considered one of the most potent cardioprotective isoforms (17). In addition,

CONTACT Patricia Canto ipcanto@yahoo.com.mx; ipcanto64@gmail.com Obesity Research Unit, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico & Obesity Clinic, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga No. 15, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, CP 14000, Mexico, DF, México.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/iceh.

© 2018 Taylor & Francis

Heinonen et al. (18), found that class 3 obese individuals have increased plasma apelin concentrations, correlating with BMI.

Although a high BMI is significantly associated with an increased risk of developing hypertension, there are individuals with excess fat that are normotensive. This implies that in some individuals with obesity, isoforms of some adipokines such as apelin could be associated with the development of obesity-related hypertension. On these bases, the aim of this study was to investigate if serum concentrations of apelin-36, apelin-17, apelin-13 or apelin-12 were different in obesity class 3 individuals with hypertension, when compared to those without hypertension (normal or high-normal).

Subjects and methods

Subjects

Human Research Committees of the Integral Clinic of Surgery for Obesity and Metabolic Diseases, General Hospital "Dr. Rubén Leñero", CDMX, México City, were patients were included, approved the study. Informed consent was obtained from all individuals before participating in the study and all procedures performed, in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutions and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

Fifty-nine unrelated individuals, presenting obesity class 3, of Mexican-Mestizo ethnic origin from the central part of Mexico, who visited our outpatient clinics between 2014 and 2016 were included. The case group comprised individuals with hypertension, while in the control group subjects were divided in two different categories: normal BP and high-normal BP (19,20).

Body height and weight were measured at baseline. Examination was performed with patients in a standing position, wearing a hospital gown and without shoes. Height and weight were used to calculate BMI (kg/m^2). Individuals were categorized as having obesity class 3 if $\text{BMI} \geq 40.0 \text{ kg}/\text{m}^2$. Hypertension was defined as systolic BP $\geq 140 \text{ mmHg}$, diastolic BP $\geq 90 \text{ mmHg}$ or by the use of at least one class of antihypertensive drug [belonging to the group of the angiotensin receptor blockers (ARBs)]. The control group, not taking any antihypertensive medication, was divided based on average BP: normal (systolic and diastolic BP: 120–129 mmHg and $<80 \text{ mmHg}$, respectively) and high-normal (systolic and diastolic BP: 130–139 mmHg and 80–89 mmHg, respectively) (19,20).

Exclusion criteria for both groups were individuals with a diagnosis of diabetes mellitus, evidence of cardiac or renal failure, and women who were postmenopausal. In addition, we excluded those individuals who used angiotensin-converting enzyme inhibitors as an antihypertensive drug, or who had secondary hypertension.

Methods

Peripheral blood samples were taken in the morning (8.00–10.00 am) after an 8–12-h fasting period. Plasma glucose and lipid parameters (total cholesterol, high-density lipoprotein

(HDL)-cholesterol, and triglycerides) were measured using the Synchron CX analyzer (Beckman Systems, Fullerton, CA). Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) was calculated by the Friedewald formula.

Measurements of all apelin isoforms were performed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits: for apelin-36 assay ID: CEB865Hu, for apelin-17 assay ID: CED065Hu, for apelin-13 assay ID: CEB887Hu, and for apelin-12 assay ID: CEA856Hu (Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA). The ELISA assay was performed on an automatic ELISA microplate reader (iMARK™, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA), and analyzed by microplate manager[®] 6 Software version 6.3 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Assay sensitivity for apelin-36 was 2.63 pg/mL, while the detection range was 121.1–762.6 pg/mL; for apelin-17 the sensitivity of the assay was 9.14 pg/mL, and the detection range was 102.8–2120.2 pg/mL, for apelin-13 assay sensitivity was 8.24 pg/mL, and the detection range was 11.8–895.6 pg/mL, and for apelin-12, the sensitivity of the assay was 25.57 pg/mL, and the detection range was 63.1–6190.7 pg/mL. Intra-assay coefficients of variation (CVs) were $<10\%$, while the inter-assay CVs were $<12.0\%$, for all apelin isoforms. All experiments were performed in duplicate.

Statistical analysis

Clinical data of three groups were summarized as means \pm standard deviations. Normality of distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. All apelin isoforms have normal distribution; the results are presented as means \pm standard deviations. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed on continuous variables [body mass index (BMI), apelin isoform concentrations, total cholesterol, HDL-C, LDL-C, and triglycerides] to test the differences between the three groups. Since BMI is a covariate it was adjusted using an ANCOVA.

Analysis of differences between groups was performed by a One-way ANOVA with a Tukey test post hoc. Statistical analyses were carried out using SPSS v.22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA); a *P* value <0.05 was accepted as statistically significant.

Since there is no previous study that has analyzed the concentrations of apelin-36, apelin-17, apelin-13 and apelin-12 isoforms, in individuals with hypertension related with obesity class 3, the power of the study was calculated to detect the differences of the four apelin isoforms between the groups, according to the results obtained from the study itself. We took into consideration the mean and standard deviation of each apelin isoform of those individuals with obesity class 3 without hypertension. For this study, the number of individuals for group was sufficient to derive 80% of statistical power only for apelin-17. For apelin-36 and apelin-12 isoforms we reached a power of 52% and for the apelin-13 isoform a power of 70%.

Results

Fifty-nine individuals were included and according to the World Health Organization criteria, all of them had obesity class 3. The case group was formed by 26 individuals with

hypertension, and the control group was formed by 33 individuals, divided in normal BP (N = 23) and high-normal BP (N = 10). Ages ranged from 27–39 years. We did not observe statistical differences between total cholesterol, HDL-C, LDL-C, and triglycerides between the groups (data not shown). Most individuals were receiving monotherapy, being Losartan (50.0%) the most prescribed drug, followed by Telmisartan (10%), Hydrochlorothiazide (5%) and Metoprolol (5%); the remaining 30% were receiving a combined therapy (15% Losartan/Hydrochlorothiazide and 15% took Telmisartan/Hydrochlorothiazide). Clinical characteristics are shown in Table 1.

We observed that individuals of the hypertensive group presented a slightly lower serum concentration of all apelin isoforms, when compared to the normotensive group, but these differences were not statistically significant (Table 2). These results were more evident when the group of patients without hypertension were divided based in normal and high-normal BP.

Serum concentrations of apelin-17 were different between individuals with normal (997 ± 459 pg/mL) versus high-normal BP (1458 ± 498 pg/mL) and these differences were even bigger when comparing individuals with high-normal BP and patients with hypertension (855 ± 494 pg/mL). These differences were statistically significant ($P < 0.018$ and $P < 0.004$, respectively) (Table 3, and Figure 1, panel B).

Regarding serum concentrations of apelin-36, apelin-13 and apelin-12 isoforms, we found that the group of individuals with high-normal BP presented the highest concentrations of all isoforms, when compared to individuals with normal BP and when compared to the group of individuals with hypertension; however, these differences were not statistically significant (Table 2, and Figure 1, panel A, C and D).

Discussion

Obesity has been associated with an increased risk of other pathologies, including hypertension (21). In México, the National Survey performed in 2012, reported that the prevalence of hypertension in adults was of 31.5%, increasing in individuals with obesity to 42.3% (22). On the other hand, it is well known that hypertension is an important risk factor for several cardiovascular diseases (23).

The specific mechanisms by which obesity induces hypertension have not been precised; however, there are several possible biological pathways among which, the apelinergic system is involved. Apelin acts through the apelin receptor

Table 1. Clinical and biochemical parameters of individuals with class 3 obesity, with and without hypertension.

Variables	Normal BP N = 23	High-Normal BP N = 10	Hypertension N = 26
Sex, m/f (N)	3/20	3/7	6/20
Age (years)	32 ± 5	33 ± 6	34 ± 5
BMI (kg/m ²)	42 ± 5*	44 ± 10	48 ± 8*

Total individuals included = 59. Controls were individuals with class 3 obesity without hypertension divided in normal or high-normal blood pressure (BP). Cases are individuals with class 3 obesity and hypertension. M = male; f = female. N = number of individuals; Data are mean ± standard deviation. BMI = body mass index. * $P < 0.015$

Table 2. Human apelin isoform concentrations of individuals with class 3 obesity, with and without hypertension.

Variables	Without hypertension (N = 33)	Hypertension (N = 26)
Apelin-36 (pg/mL)	443 ± 157	430 ± 146
Apelin-17 (pg/mL)	1105 ± 515 *	855 ± 494*
Apelin-13 (pg/mL)	298 ± 274	210 ± 189
Apelin-12 (pg/mL)	2566 ± 1454	2049 ± 1599

Total individuals = 59. Controls are individuals with class 3 obesity without hypertension; Cases are individuals with class 3 obesity and hypertension. N = number of individuals; Data are mean ± standard deviations. * $P = 0.071$.

Table 3. Human apelin isoform concentrations of individuals with class 3 obesity, with and without hypertension.

Variables	Normal BP (N = 23)	High-normal BP (N = 10)	Hypertension (N = 26)
Apelin-36 (pg/mL)	419 ± 160	499 ± 146	430 ± 146
Apelin-17 (pg/mL)	997 ± 459*	1458 ± 498**,**	855 ± 494**,**
Apelin-13 (pg/mL)	253 ± 225	435 ± 324	210 ± 189
Apelin-12 (pg/mL)	2459 ± 1284	3103 ± 1693	2049 ± 1599

Total individuals = 59. Controls were individuals with class 3 obesity without hypertension divided in normal or high-normal blood pressure (BP); Cases are individuals with class 3 obesity and hypertension. N = number of individuals; Data are mean ± standard deviations. * $P < 0.018$; ** $P < 0.004$.

(APJ) to exert an effect on cardiovascular homeostasis, cell proliferation and angiogenesis. Thus, unbalance in the apelinergic system plays a role in systemic arterial hypertension and cardiovascular diseases (24–27). Besides, exogenous apelin administration causes a rapid nitric oxide (NO)-dependent fall in BP, as well as in the mean capillary filling pressure in rodents, indicating powerful vasodilator and venodilator effects (28).

It has been described that apelin has several isoforms, raising the question if these isoforms play a role in the genesis of hypertension associated with obesity. Taking into consideration, that some individuals with obesity present predisposition for developing hypertension, it is important to establish the possible role that apelin isoforms could play in the genesis of hypertension in these individuals. Therefore, in the present study we analyzed if serum concentrations of apelin isoforms were different in those individuals with obesity class 3 with hypertension, from those patients with obesity class 3 without hypertension (divided in normal and high-normal BP).

Several studies have described that individuals with hypertension exhibit decreased levels of circulating apelin. Sonmez et al. (29), compared plasma apelin levels in young men with essential hypertension with healthy controls. Both groups of individuals had a normal BMI or were overweight. These authors found significantly lower levels of plasma apelin in patients with essential hypertension. On the other hand, Przewlocka-Kosmala et al. (26), compared the plasma concentrations of apelin and their relationship to left ventricular function, in patients with overweight or with obesity and essential hypertension, versus healthy volunteers with normal BMI or overweight and without hypertension. These authors found that hypertensive patients with low plasma apelin concentrations presented impairment in left ventricular systolic and diastolic function. In addition, they observed that hypertensive patients presented lower plasma apelin concentrations when compared to healthy individuals. Further, Baysal et al. (30), carried out a study in which plasma apelin concentrations were analyzed, in patients with essential hypertension and in healthy individuals

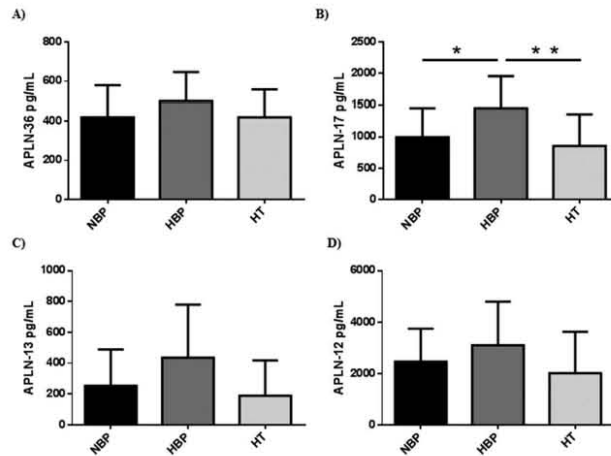


Figure 1. Serum concentrations of apelin isoforms in individuals with obesity class 3 with hypertension (HT) and individuals without hypertension divided in normal blood pressure (NBP) or high-normal blood pressure (HBP). A) Serum concentrations of apelin-36; B) Serum concentrations of apelin-17; C) Serum concentrations of apelin-13 and D) Serum concentrations of apelin-12. **Serum concentrations of apelin-17 were statistically different between individuals with normal versus high-normal BP ($P < 0.018$) and between individuals with high-normal BP and patients with hypertension ($P < 0.004$) (panel B). Data are shown as mean \pm standard deviation.**

with normal BMI or overweight. Besides, they investigated if plasma apelin concentrations changed when hypertensive patients received an angiotensin II receptor antagonist or a calcium antagonist. These authors found that apelin concentrations were significantly lower in patients with hypertension than in controls, and these concentrations increased significantly after receiving antihypertensive therapy for one month.

Moreover, Skoczylas et al. (31), studied plasma concentrations of apelin in patients with obesity and essential hypertension, individuals with obesity without hypertension, and healthy individuals with normal BMI. These authors did not observe significant differences among the three groups; nevertheless, a tendency toward lower levels was observed in hypertensive patients. In addition, plasma concentrations of apelin increased significantly after the prescription of an antihypertensive treatment in both groups of obese individuals with and without hypertension.

It is important to consider that in all the studies mentioned above, only total levels of apelin were measured.

Interestingly, Liakos et al. (32), conducted a study in which they analyzed apelin and visfatin concentrations in individuals without hypertension, categorized in high-normal BP or normal or optimal BP. These authors observed that apelin concentrations were significantly lower in those individuals with high-normal BP in comparison to subjects with normal or optimal BP, suggesting that their results may partially explain the higher cardiovascular risk of the high-normal BP group, indicating that early pathophysiological changes may be present even in the absence of sustained hypertension.

Contrasting with the results of Liakos et al. (32), we found that the group of individuals with high-normal BP presented higher concentration of all isoforms of apelin when compared to those individuals with normal BP. These differences might be due to the fact that those individuals studied were older in

age and they had a normal BMI or were overweight. Besides, only total levels of apelin were determined in contrast to our study where all individuals were younger, presented obesity class 3 and four isoforms of apelin were evaluated.

Indeed, we found that apelin-17 was higher in individuals with high-normal BP when compared to subjects with normal BP, as well as when compared to subjects with hypertension. In relation of the latter, is important to mention that the diagnosis of arterial hypertension of our patients was based on those criteria proposed by the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8) (19) and by the Task Force Members 2013 of the ESH/ESC Guidelines European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) (20). However, in 2017 BP was categorized into 4 levels based on average BP: normal, elevated, and hypertension stage 1 or stage 2 Whelton et al. (33). In this context, our patients whom were classified in the group of high-normal BP, with the new guidelines Whelton et al. (33) had hypertension stage 1. Noteworthy, this group of patients who presented higher serum concentrations of apelin-17 isoform did not receive any type of antihypertensive medication, in contrast with the other hypertensive patients, suggesting that the higher concentrations of apelin-17 observed in our high-normal BP group could be the consequence of a compensatory mechanism that tries to reduce BP through the vasodilatory effect of apelin (9). Further, El Messari et al. (34), observed that the K17F peptide (apelin-17) was the most efficient activator of apelin receptor internalization, proposing that this effect is required for the hypotensive capacity of the K17F peptide. The group of patients that presented hypertension showed a lower concentration of apelin-17 (and all isoforms too) when compared to the group without hypertension. This observation could be due

to the fact that these patients were taking antihypertensive medication, so they had blood pressure in normal values.

This study has some limitations: the small number of individuals; the population is composed mainly of female individuals, which may have a direct effect on the comparisons made; the use of a cross-sectional design, which makes it difficult to determine the possible causal effects of our findings.

In conclusion, to our knowledge, this is the first study regarding the differences of apelin-17 isoform concentrations in individuals pertaining to different categories of BP, who presented obesity class 3. Further studies can contribute towards a detailed understanding of the functional role of each apelin isoform, within the mechanisms of hypertension development in individuals with obesity and elevated BP.

Acknowledgments

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Grant number: 2011-C01-161909) and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica), México; Grant: 250786.

Luis Javier Cano Martínez was supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, fellowship award.

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the PhD degree of Luis Javier Cano Martínez at the Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [2011-C01-161909 and 250786];

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

"All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committees and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [2011-C01-161909 and 250786];

Informed consent

Informed consent was obtained from all individuals included in the study.

References

1. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury

- attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet*. 2012;380:2224–60.
2. Hernández Ávila M, Rivera Dommarco J, Shamah Levy T, Cuevas Nasu L, Gómez Acosta LM, Gaona Pineda EB, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (MC). Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2016.
3. Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML. Weight gain-induced blood pressure elevation. *Hypertension*. 2000;35:1135–40.
4. Huang Z, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA. Body weight, weight change and risk for hypertension in females. *Ann Intern Med*. 1998;128:81–88.
5. Itoh K, Imai K, Masuda T, Abe S, Tanaka M, Koga R, Itoh H, Matsuyama T, Nakamura M. Relationship between changes in serum leptin levels and blood pressure after weight loss. *Hypertens Res*. 2002;25:881–86.
6. Prospective Studies Collaboration, Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R; et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373:1083–96.
7. Rega-Kaun G, Kaun C, Wojta J. More than a simple storage organ: adipose tissue as a source of adipokines involved in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*. 2013;110:641–50.
8. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251:471–76.
9. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*. 2001;99:87–92.
10. Foldes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Mayranpaa M, Sarman B, Seres L, Skoumal R, et al. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:480–85.
11. Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpené C, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*. 2005;146:1764–71.
12. Szokodi I, Tavi P, Földes G, Vuolteenaho M, Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuhola J, Rysä J, Tóth M, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*. 2002;91:434–40.
13. Cheng X, Cheng XS, Pang CC. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur J Pharmacol*. 2003;470:171–75.
14. Seyedabadi M, Goodchild AK, Pilowsky PM. Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Auton Neurosci*. 2002;101:32–38.
15. Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM. Apelin-13 induces a biphasic haemodynamic response and hormonal activation in normal conscious sheep. *J Endocrinol*. 2006;189:701–10.
16. Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2006;8:355–60.
17. Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, Lim SY, Wynne AM, Smith CC. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia–reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2007;102:518–28.
18. Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Pirinen E, Alhava E, Akerman K, Herzig KH. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept*. 2005;130:7–13.

19. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, et al. evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Jama*. 2014;311:507–20.
20. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, et al. Task Force Members 2013 ESH/ESC 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*. 2013;31:1281–357.
21. Susic D, Varagic J. Obesity: a perspective from hypertension. *Med Clin North Am*. 2017;101:139–57.
22. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
23. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brenner SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *Jama*. 2003;290:898–904.
24. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *Embo J*. 2008;27:522–34.
25. Japp AG, Cruden NL, Barnes G, Van Gemeren N, Mathews J, Adamson J, Johnston NR, Denvir MA, Megson IL, Flapan AD, et al. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2010;121:1818–27.
26. Przewlocka-Kosmala M, Kotwica T, Mysiak A, Kosmala W. Reduced circulating apelin in essential hypertension and its association with cardiac dysfunction. *J Hypertens*. 2011;29:971–79.
27. Wang W, McKinnie SM, Patel VB, Haddad G, Wang Z, Zhabyyev P, Das SK, Basu R, McLean B, Kandalam V, et al. Loss of Apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic Apelin analogues. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000249.
28. Japp AG, Newby DE. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*. 2008;5:1882–92.
29. Sonmez A, Celebi G, Erdem G, Tapan S, Genc H, Tasci I, Ercin CN, Dogru T, Kilic S, Uckaya G, et al. Plasma apelin and ADMA levels in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2010;32:179–83.
30. Baysal SS, Pirat B, Okyay K, Bal UA, Uluçam MZ, Öztuna D, Müderrisoğlu H. Treatment-associated change in apelin concentration in patients with hypertension and its relationship with left ventricular diastolic function. *Anatol J Cardiol*. 2017;17:125–31.
31. Skoczylas A, Piecha G, Więcek A. Effects of antihypertensive treatment on plasma apelin, resistin, and visfatin concentrations. *Pol Arch Med Wewn*. 2016;126:243–53.
32. Liakos CI, Sanidas EA, Perrea DN, Grassos CA, Chantziara V, Viniou NA, Barbetseas JD, Papadopoulos DP. Apelin and visfatin plasma levels in healthy individuals with high normal blood pressure. *Am J Hypertens*. 2016;29:549–52.
33. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APHA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines. *Hypertension*. 2017 Nov 13;pii: HYP.0000000000000065. [Epub ahead of print]. doi:10.1161/HYP.0000000000000065.
34. El Messari S, Iturriz X, Fassot C, De Mota N, Roesch D, Llorens-Cortes C. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J Neurochem*. 2004;90:1290–301.

20. Referencias

1. Aroor A. R., McKarns S., Demarco V. G., Jia G. and Sowers J. R. 2013. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism*. **62**: 1543–1552.
2. Bai B., Cai X., Jiang Y., Karteris E., Chen, J. 2014. Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK(1/2) and cell proliferation via Gαq-mediated mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **18**: 2071-2081.
3. Bai B., Liu L., Zhang N., Wang C., Jiang Y., Chen, J. 2014b. Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics. *Cellular Signalling*. **26**: 1549-1559.
4. Barquera S., Campos-Nonato I., Herrera-Barrera L., Villalpando S., Rodríguez-Gilabert C., Durazo-Arvizu R. y Aguilar-Salinas C. 2010. Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud pública de México*. **52**: S63-S71.
5. Bassareo P. y Mercurio G. 2014. Pediatric hypertension: An update on a burning problema. *World J. Card*. **6**(5): 253-259.
6. Bender S. B., McGraw A. P., Jaffe I. Z. and Sowers J. R. 2013. Mineralocorticoid receptor-mediated vascular insulin resistance: an early contributor to diabetes-related vascular disease? *Diabetes*. **62**: 313–319.
7. Benjafield A. y Morris B. 2000. Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertens*. **13**: 994-998.
8. Bhattacharya R., SenBanerjee S., Lin Z., Mir S., Hamik A., Wang P., Mukherjee P., Mukhopadhyay D. y Jain, M. 2005. Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2. *J. Biol. Chem*. **280**: 28848–28851.
9. Black J., Premont R., Daaka Y. 2015. Feedback Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling by GRKs and Arrestins. *Semin Cell Dev Biol*. **50**: 95–104.
10. Blanco-Rivero J., Cachofeiro V., Lahera V., Aras-Lopez R., Márquez-Rodas I., Salices M., Xavier FE., Ferrer M., Balfagón G. 2005. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **46**: 107–112.

11. Boucher J., Masri B., Daviaud D., Gesta S., Guigné C., Mazzucotelli A., Castan-Laurell I., Tack I., Knibiehler B., Carpené C., Audigier Y., Saulnier-Blache J. and Valet P. 2005. Apelin, a Newly Identified Adipokine Up-Regulated by Insulin and Obesity. *Endocrinology*. **146**(4): 1764–1771.
12. Brame A., Maguire J., Yang P., Dyson A., Torella R., Cheriyan J., Singer M., Glen R., Wilkinson I., Davenport A. 2015. Design, Characterization, and First-In-Human Study of the Vascular Actions of a Novel Biased Apelin Receptor Agonist. *Hypertension*. **65**: 00-00.
13. Brown N. J. 2013. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **9**: 459–469.
14. Butruille L., Drougard A., Knauf C., Moitrot E., Valet P., Storme L., Deruelle P., Lesage J. 2013. The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice. *Peptides*. **46**: 94–101.
15. Canstan-Laurell I., Vitkova M., Daviaud D., Dray C., Kovacikova Z., Kovacova Z., Hejnova J., Stich V. and Valet P. 2008. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *European Journal of Endocrinology*. **158**: 905-910.
16. Cavalcante JL., Lima J., Redheuil A. and Al-Mallah MH. 2011. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**: 1511–1522.
17. Muniyappa R. and Sowers JR. 2013. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**: 5–12.
18. Charo D., Ho M., Fajardo G., Kawana M., Kundu R., Sheikh A., Finsterbach T., Leeper N., Ernst K., Chen M., Ho Y., Chun H., Bernstein D., Ashley E., Thomas Quertermous T. 2009. Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **297**: H1904–H1913.
19. Daviaud D., Boucher J., Gesta S., Dray C., Guigne C., Quilliot D., Ayav A., Ziegler O., Carpené C., Saulnier-Blache J., Valet P., Castan-Laurell I. 2006. TNF alpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB Journal*. **20**: 1528-1530.
20. Druppel V., Kusche-Vihrog K., Grossmann C., Gekle M., Kasprzak B., Brand E., Pavenstädt H., Katrin Kliche HO. 2013. Long-term application of the aldosterone antagonist spironolactone prevents stiff endothelial cell syndrome. *FASEB J.* **27**: 3652–3659.

21. El Messari S., Iturrioz X., De Mota N., Fassot C., Alvear-Perez R., Maigret B., Llorens-Cortes C. 2004. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *Journal of Neurochemistry*. **90**: 1290–1301.
22. Engeli S., Negrel R. and Sharma A. M. 2000. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. **35**: 1270–1277.
23. Esteban-Martínez R., Pérez-Razo J., Vargas-Alarcón G., Martínez-Rodríguez N., Cano-Martínez L., López-Hernández L., Rojano-Mejía D., Canto P., Coral-Vazquez R. Polymorphisms of APLN-APLNR system are associated with essential hypertension in Mexican-Mestizo individuals. *Experimental and Molecular Pathology*. **101**: 105–109.
24. Eyries M., Siegfried G., Ciumas M., Montagne K., Agrapart M., Lebrin F., Soubrier F. 2008. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circulation Research*. **103**: 432-440.
25. Femia R., Kozakova M., Nannipieri M., Gonzales-Villalpando C., Stern MP., Haffner SM., Ferrannini E. 2007. Carotid intima-media thickness in confirmed prehypertensive subjects: predictors and progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**: 2244–2249.
26. Franklin S. 2007. Importancia de la presión arterial diastólica en relación con la edad. Hipertensión (Madr.). **24**(4): 172-175.
27. Glassford A., Yue P., Sheikh A., Chun H., Zarafshar S., Chan D., Reaven M., Quertermous T., Tsao P. 2007. HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. **293**: E1590-1596.
28. Gerbier R., Alvear-Perez R., Margathe J., Flahault A., Couvineau P., Gao J., De Mota N., Dabire H., Li B., Ceraudo E., Hus-Citharel A., Esteouille L., Bisoo C., Hibert M., Berdeaux A., Iturrioz X., Bonnet D., Llorens-Cortes C. 2016. Development of original metabolically-stable apelin-17 analogs with diuretic and cardiovascular effects. *FASEB J*. **31**: 000–000.
29. Han S., Wang G., Qi X., Englander E., Greeley G. 2008. Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. **295**: G1068-1078.

30. Han X., Zhang D., Yin D., Zhang Q., Liu W. 2013. Apelin-13 deteriorates hypertension in rats after damage of the vascular endothelium by ADMA. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **91**: 708-714.
31. Hashimoto T., Kihara M., Ishida J., Imai N., Yoshida S., Toya Y., Fukamizu A., Kitamura H., Umemura S. 2006. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **26**: 1267-1272.
32. Heinonen M., Laaksonen D., Karhu T., Karhunen L., Laitinen T., Kainulainen S., Rissanen A., Niskanen L., Herzig K. 2009. Effect of diet-induced weight loss on plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. **19**: 626-633.
33. Henry S. L., Barzel B., Wood-Bradley R. J., Burke S. L., Head G. A., Armitage J. A. 2012. Developmental origins of obesity-related hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39**: 799–806.
34. He F. J. and MacGregor G. A. 2002. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J. Hum. Hypertens.* **16**: 761–770.
35. Hosoya M., Kawamata Y., Fukusumi S., Fujii R., Habata Y., Hinuma S., Kitada C., Honda S., Kurokawa T., Onda H., Nishimura O. and Fujino M. 2000. Molecular and Functional Characteristics of APJ. *JBC*. **275**: 21061-21067.
36. Hwangbo C., Wu J. Papangeli I., Adachi T., Sharma B., Park S., Zhao L., Ju H., Go G., Cui G., Inayathullah M., Job J., Rajadas J., Kwei S., Li M., Morrison A., Quertermous T., Mani A., Red-Horse K., Chun H. 2017. Endothelial APELINAR regulates tissue fatty acid uptake and is essential for apelin's glucose-lowering effects. *Sci Transl. Med.* **9**: eaad4000.
37. Ishida J., Hashimoto T., Hashimoto Y., Nishiwaki S., Iguchi T., Harada S., Sugaya T., Matsuzaki H., Yamamoto R., Shiota N., Okunishi H., Kihara M., Umemura S., Sugiyama F., Yagami K., Kasuya Y., Mochizuki N., Fukamizu A. 2004. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem*. **279**(25): 26274–26279.
38. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, et al. 2014. Evidence-based

- guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Jama*. **311**: 507–20.
39. Japp A. and Newby D. 2008. The apelin–APJ system in heart failure Pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology*. **75**: 1882-1892.
40. Jia X., Lu, Z., Zhang J., Pan C., Yang, J., Zhao J., Yu F., Duan X., Tang C., Qi, Y. 2007. Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides*. **28**: 2023-2029.
41. Johnson R. J., Rodriguez-Iturbe B., Kang D. H., Feig D. I. and Herrera-Acosta J. 2005. A unifying pathway for essential hypertension. *Am. J. Hypertens*. **18**: 431–440.
42. Kagiya S., Fukuhara M., Matsumura K., Lin Y., Fujii K., Iida M. 2005. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regulatory Peptides*. **125**: 55-59.
43. Kalea Z., and Batlle D. 2010. Apelin and ACE2 in cardiovascular disease. *Current Opinion in Investigational Drugs*. **11**: 273-282.
44. Katugampola, S., Maguire J., Matthewson S., Davenport A. 2001. [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *British Journal of Pharmacology*. **132**: 1255-1260.
45. Kehoe K., Van Elzen R., Verkerk R., Sim Y., Van der Veken P., Lambeir A., De Meester I. 2016. Prolyl carboxypeptidase purified from human placenta: its characterization and identification as an apelin-cleaving enzyme. *Biochimica et Biophysica*. **1864**: 1481–1488.
46. Klein, M., and Davenport, A. 2004. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regulatory Peptides*. **118**: 119-125.
47. Klein, M., Skepper, J., and Davenport A. 2005. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regulatory Peptides*. **126**: 233-240.
48. Krist J., Wieder K., Klötting N., Oberbach A., Kralisch S., Wiesner T., Schön M., Gärtner D., Dietrich A., Shang E., Lohmann T., Drebler M., Fasshauer M., Stumvoll M. and Matthias Blüher. 2013. Effects of Weight Loss and Exercise on Apelin Serum Concentrations and Adipose Tissue Expression in Human Obesity. *Obes Facts*. **6**: 57-69.

49. Kunduzova O., Alet N., Delesque-Touchard N., Millet L., Castan-Laurell I., Muller C., Dray C., Schaeffer P., Herault J., Savi P., Bono F., Valet P. 2008. Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J.* **22**: 4146–4153.
50. Kurukulasuriya L. R., Stas S., Lastra G., Manrique C. and Sowers J. 2011. Hypertension in obesity. *Med. Clin. North Am.* **95**: 903–917.
51. Landsberg L., Aronne LJ., Beilin LJ., Burke V., Igel LI., Lloyd-Jones D., Sowers J. 2013. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment—a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring)*. **21**: 8–24.
52. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George S., and O'Dowd B. 2000. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of Neurochemistry*. **74**: 34-41.
53. Liakos C., Sanidas E., Perrea D., Grassos C., Chantziara V., Viniou , Barbetseas J. and Papadopoulos D. 2015. Apelin and Visfatin Plasma Levels in Healthy Individuals With High Normal Blood Pressure. *Am J Hypertens*. **29** (5): 549-52.
54. Li W., Niu W., Zhang Y., Wu S., Gao P., Zhu D. 2009. Family-based analysis of apelin and AGTRL1 gene polymorphisms with hypertension in Han Chinese. *J. Hypertens*. **27**: 1194–1201.
55. Li Y., Chen J., Bai B., Du H., Liu Y., Liu H. 2012. Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction. *Cellular Signalling*. **24**: 991-1001.
56. Maguire J., Kleinz M., Pitkin S., Davenport A. 2009. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension*. **54**: 598-604.
57. Malik V. S., Willett W. C. & Hu F. B. 2013. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**: 13–27.
58. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Bohm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, et al. 2013. Task Force Members 2013 ESH/ESC 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.* **31**: 1281–357.
- 59.** McLean D., Kim J., Kang Y., Shi H., Atkins B., Jain M., Chun H. 2012. Apelin/APJ Signaling Is a Critical Regulator of Statin Effects in Vascular Endothelial Cells—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **32**: 2640-2643.
- 60.** McKinnie S., Fischer C., Tran M., Wang W., Mosquera F., Oudit G., Vederas, J. 2016. The metalloprotease neprilysin degrades and inactivates apelin peptides. *ChemBioChem.* **17**: 1495-1498.
- 61.** Mishra A., Samantha Kohli S., Dua S., Thinlas T., Ghulam Mohammad G., Qadar Pasha M. 2015. Genetic differences and aberrant methylation in the apelin system predict the risk of high-altitude pulmonary edema. *PNAS.* **19**: 6134-6139.
- 62.** Mughal A., Sun C., O'Rourke S. 2018. Apelin reduces nitric oxide-induced relaxation of cerebral arteries by inhibiting activation of large-conductance, calcium-activated K Channels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* **71**: 223-232.
- 63.** Murga C., Laguinge L., Wetzker R., Cuadrado A., Gutkind, J. 1998. Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma. *Journal of Biological Chemistry.* **273**: 19080-19085.
- 64.** Najafipour H., Soltani-Hekmat A., Nekooian A., Esmaeili-Mahani S. 2012. Apelin receptor expression in ischemic and non- ischemic kidneys and cardiovascular responses to apelin in chronic two-kidney-one-clip hypertension in rats. *Regulatory Peptides.* **178**: 43-50.
- 65.** Najafipour H., Vakili A., Shahouzehi B., Soltani Hekmat A., Masoomi Y., Yeganeh Hajahmadi M., Esmaeli-Mahani S. 2015. Investigation of changes in apelin receptor mRNA and protein expression in the myocardium and aorta of rats with two-kidney, one-clip (2K1C) Goldblatt hypertension. *Journal of Physiology and Biochemistry.* **71**: 165-175.
- 66.** O'Dowd B., Heiber M., Chan A., Heng H., Tsui L., Kennedy J., Shi X., Petronis A., George S., Nguyen T. 1993. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* **136** (1–2): 355–360.
- 67.** Oparil, S., Zaman, A. y Calhoun, D. 2003. Pathogenesis of Hypertension. *Ann Intern Med.* **139**: 761-776.

68. Paul M., Poyan M., Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* **86** (3):747–803
69. Pitkin S., Maguire J., Bonner T., Davenport A. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacological Reviews.* **62**: 331-342.
70. Przewlocka-Kosmala M., Kotwica T., Mysiak A., Kosmala W. 2011. Reduced circulating apelin in essential hypertension and its association with cardiac dysfunction. *J. Hypertens.* **29**(5): 971-9.
71. Rumantir M. S., Vaz M., Jennings GL., Collier G., Kaye DM., Seals DR., Wiesner GH., Brunner-La HP., Esler MD. 1999. Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *J. Hypertens.* **17**: 1125–1133.
72. Salcedo A., Garijo J., Monge L., Fernández N., García-Villalón A., Sánchez Turrión V., Cuervas-Mons V., Diéguez G. 2007. Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids. *Regulatory Peptides.* **144**: 50-55.
73. Sato T., Suzuki T., Watanabe H., Kadowaki A., Fukamizu A., Liu P., Kimura A., Ito H., Penninger J., Imai Y., and Kuba K. 2013. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. *The Journal of Clinical Investigation.* **123** (12): 5203-5211.
74. Schinzari F., Veneziani A., Mores N., Barini A., Di Daniele N., Cardillo C. and Tesaro M. 2017. Beneficial Effects of Apelin on Vascular Function in Patients With Central Obesity. *Hypertension.* **69**: 00-00.
75. Seyedabadi M., Goodchild A., Pilowsky P. 2002. Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Auton Neurosci.* **101**(1–2): 32–38.
76. Shin K., Pandey A., Liu X., Anini Y. and Rainey J. 2013. Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity. *FEBS Open Bio.* **3**: 328-333.
77. Siddiquee K., Hampton J., McAnally D., May L., Smith L. 2013. The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *British Journal of Pharmacology.* **168**: 1104-1117.
78. Soriguer F., Garrido-Sanchez L., Garcia-Serrano S., Garcia-Almeida J., Garcia-Arnes J. Tinahones F y Garcia-Fuentes E. 2009. Apelin Levels Are Increased in Morbidly Obese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *OBES SURG.* **19**: 1574-1580.

79. Szasz T., Bomfim G. F. and Webb R. C. 2013. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc. Health Risk Manag.* **9**: 105–116.
80. Tatemoto K., Hosoya M., Habata Y., Fujii R., Kakegawa T., Zou M., Kawamata Y., Fukusumi S., Hinuma S., Kitada C., Kurokawa T., Onda H., Fujino M. 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* **251**(2): 471-6.
81. Than A., Zhang X., Leow M., Poh C., Chong S. and Chen P. 2014. Apelin Attenuates Oxidative Stress in Human Adipocytes. *JBC.* **289**: 3763-3774.
82. Vasdev S., Gill, V., Parai S. & Gadag V. 2007. Fructose-induced hypertension in Wistar-Kyoto rats: interaction with moderately high dietary salt. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **85**: 413–421.
83. Vickers C., Hales P., Kaushik V., Dick L., Gavin J., Tang J., Godbout K., Parsons T., Baronas E., Hsieh F., Acton S., Patane M., Nichols A., and Tummino P. 2002. Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry.* **277** (17): 14838-14843.
84. Wang W., McKinnie S., Farhan M., Paul M., McDonald T., McLean B., Llorens-Cortes C., Hazra S., Murray A., Vederas J., Oudit G. 2016. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17. *Hypertension.* **68** (2): 365-77.
85. Wang W., Bodiga S., Das S., Lo J., Patel V., Oudit G. 2012. Role of ACE2 in diastolic and systolic heart failure. *Heart Fail Rev.* **17**(4–5): 683–691.
86. Weisbrod R. M., Shiang T., Al Sayah L., Fry JL., Bajpai S., Reinhart-King CA., Lob HE., Santhanam L., Mitchell G., Cohen RA., Seta F. 2013. Arterial stiffening precedes systolic hypertension in diet-induced obesity. *Hypertension.* **62**: 1105–1110.
87. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines. *Hypertension.* 2017 Nov 13; pii: HYP.0000000000000065. [Epub ahead of print]. doi: 10.1161/ HYP.0000000000000065.

88. Wu H., CHeng X., Hao C., ZHANG Z., Yao H., MuroHara T., Dai Q. 2014. Regulation of Apelin and Its Receptor Expression in Adipose Tissues of Obesity Rats with Hypertension and Cultured 3T3-L1 Adipocytes. *Exp. Anim.* **63**(2): 257–267.
89. Yang P., Kuc R., Brame L., Dyson A., Singer M., Glen R., Cheriyan J., Wilkinson B., Davenport A., Maguire J. 2017. [Pyr1]Apelin-13(1-12) is a biologically active ACE2 metabolite of the endogenous cardiovascular peptide [Pyr1]Apelin-13. *Frontiers in Neuroscience.* **11**: 92.
90. Yiannikouris, Gupte M., Putnam K., Thatcher S., Charnigo R., Rateri DL., Daugherty A., Cassis LA. 2012. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. *Hypertension.* **60**: 1524–1530.
91. Zhang C., Xia C., Jiang M., Zhu M., Zhu J., Du D., Liu M., Wang J., Zhu D. 2013. Repeated electroacupuncture attenuating of apelin expression and function in the rostral ventrolateral medulla in stress-induced hypertensive rats. *Brain. Res Bull.* **97**:53–62.
92. Zhang Q., Yao F., Raizada M., O'Rourke S., Sun C. 2009. Apelin gene transfer into the rostral ventrolateral medulla induces chronic blood pressure elevation in normotensive rats. *Circ Res.* **104**(12): 1421–1428.
93. Zhen E., Higgs R., Gutierrez J. 2013. Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Analytical Biochemistry.* **442**: 1–9.
94. Zhu P., Huang F., Lin F., Yuan Y., Chen F. & Li Q. 2013. Plasma apelin levels, blood pressure and cardiovascular risk factors in a coastal Chinese population. *Ann Med.* **45**: 494–498.

21. Anexos

Anexo 1. Cuantificación de RNA

El espectrofotómetro ND-1000 ayuda a estimar la cantidad de RNA total y verificar su calidad, dependiendo de la densidad óptica obtenida a tres diferentes longitudes de onda 230nm, 260 nm y 280 nm. Se consideró que el RNA tiene una pureza adecuada cuando el cociente de densidad óptica 260/280 fue ≥ 1.8 y la relación 230/260 ≥ 1.5 . Todos los extractos de RNA total cumplieron con el grado de pureza adecuado.

Procedimiento:

- Colocar 1 μL de H_2O pura en el lector del aparato, cerrar el brazo del lector y realizar la asignación del elemento considerado blanco
- Limpiar el lector utilizando solamente material apropiado (*kim wipes*)
- Colocar ahora 1 μL de la muestra problema y realizar la lectura
- Tomar los datos referentes a esa lectura

Anexo 2 Integridad RNA

La integridad de las muestras de RNA total fue evaluada en gel de agarosa al 1.5%. Todas las muestras de RNA total se mantuvieron integras.

Pasos:

- Preparar gel de agarosa al 1.5%, colocar en cámara de electroforesis con una solución buffer TBE 1X
- A 2 μ L de muestra agregar 3 μ L de buffer de carga 6X, cargar en el gel y correr a 60V durante 1 h
- Observar en el transiluminador (Fig.)

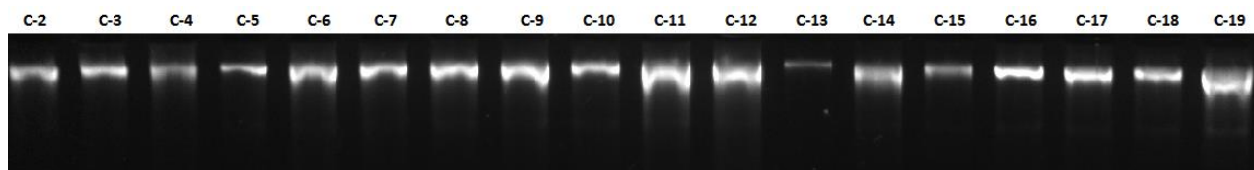


Figura 4 Gel de integridad de RNA. Se presentan las muestras de RNA de tejido adiposo visceral separadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Anexo 4. Condiciones de PCR en tiempo real

Las condiciones del ensayo de qRT-PCR fueron realizados en la Unidad de Investigación en Obesidad (Unidad Periférica de la UNAM) localizada dentro del Instituto de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Subirán (INCMNSZ). Además, se compararon dos volúmenes de reacción final: (1) volumen total de 20 μL (como lo recomienda el distribuidor) y (2) con la mitad del volumen 10 μL . Los resultados no variaron entre los volúmenes, por lo que se optó por realizar la reacción con un volumen final de 10 μL (tabla 4). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Tabla 5. Volúmenes para con sondas taqman®

Reactivos	Volumen (μL)
Master Mix	5.0
Sonda Taqman®	0.5
DNA	4.5
Total	10

Anexo 5. Carta de consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

“Análisis de la expresión del sistema apelinérgico (APLN/APJ) en tejido adiposo y de las concentraciones séricas de las isoformas de apelina de individuos con obesidad grado III e hipertensión arterial”

Introducción: Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento.

Justificación del estudio: La obesidad es principal factor de riesgo para desarrollar enfermedades hipertensión arterial. El sistema apelinérgico (APLN-APJ) se ha establecido como un regulador de la presión arterial, sin embargo este sistema se desregula en la obesidad. Por lo que estudiar la transcriptómica y proteómica de este sistema en individuos con obesidad e hipertensión arterial, permitirá entender su participación en el desarrollo de la hipertensión arterial y podría generar nuevas estrategias de prevención y tratamientos para esta enfermedad.

Objetivo del estudio: Evaluar la expresión del sistema apelinérgico (APLN-APJ) en el tejido adiposo, así como analizar las concentraciones de las isoformas de apelina en el suero de individuos con obesidad grado 1 y grado 3 con y sin HTA.

Beneficios del estudio: Mediante este trabajo se podrá conocer si el sistema APLN-APJ participa en el desarrollo de la HTA.

Procedimiento del estudio: En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos. Para este estudio se le tomará una

muestra de sangre antes de la cirugía y una biopsia tejido adiposo visceral y otra de tejido adiposo subcutáneo durante la cirugía.

Riesgos asociados con el estudio: Los riesgos de la toma de muestra son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo. Los riesgos de la toma de la biopsia son: ligero sangrado en el sitio de la toma. El personal que realiza la toma de las muestras es personal es altamente calificado, lo que minimiza los riesgos de complicaciones.

Aclaraciones

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar participar.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informada y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr. o a la Sra. _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha