



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DEL GRADO DE SATURACIÓN DE
ÁCIDO GRASOS EN LA DIETA SOBRE
DIFERENTES ACTIVIDADES
AMINOPEPTIDASAS SOLUBLES Y UNIDAS A
MEMBRANA EN SUERO, TEJIDO NERVIOSO
Y OTROS TEJIDOS PERIFÉRICOS**

**PRESENTADA POR:
ANA BELÉN SEGARRA ROBLES**

**DIRIGIDA POR:
DRA. DÑA. ISABEL PRIETO GÓMEZ
DR. D. MANUEL RAMÍREZ SÁNCHEZ**

JAÉN, 31 DE OCTUBRE DE 2003

ISBN 84-8439-243-0

Nombre y apellidos del autor

ANA BELÉN SEGARRA ROBLES

Título de la Tesis Doctoral

EFFECTO DEL GRADO DE SATURACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA DIETA SOBRE
DIFERENTES ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS SOLUBLES Y UNIDAS A MEMBRANA EN
SUERO, TEJIDO NERVIOSO Y OTROS TEJIDOS PERIFÉRICOS

I.S.B.N.

84-8439-243-0

Fecha de Lectura

31 DE OCTUBRE DE 2003

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Ciencias de la Salud

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis

Dirección de la Tesis	Dra. Dña. Isabel Prieto Gómez Dr. D. Manuel Ramírez Sáncex
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Francisco Alba Aragüez
Vocales	Dr. D. Juan Manuel de Grandarias y Bajón Dr. D. Manuel Vargas Palomares Dr. D. Félix Vargas Palomares
Secretario/a	Dr. D. Francisco Vives Montero

Calificación Obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

Abstract

Multiple nutritional factors can be related with blood pressure (BP) control. Fatty acids (FA), and their derivatives such as eicosanoids, can influence BP and be involved in cardiovascular diseases. Low fat diet, with reduced saturated FA decreases substantially BP. In contrast, a positive relationship between BP and high intake of saturated FA has been found. However, the qualitative effect of different types of fat on BP control is scarcely known.

Dietary fat induces changes in brain and peripheral tissue membrane fatty acid composition. This affects membrane fluidity, eicosanoid synthesis, enzymatic activities associated to membrane, and has possible health implications. In addition, it has been suggested that dietary fat composition influences the male reproductive function, the cholesterol-phospholipid composition of the rat testicular plasma membranes and the prostaglandin metabolism and fertility.

The renin-angiotensin system (RAS) is an important regulator of BP and water homeostasis. Aminopeptidases (AP) play an important role in the regulation of RAS, and oxytocin, vasopressin and TRH release.

The aim of this study was to analyse the effect of several fats used in the diet on AP activities. Male Wistar rats were divided into six groups (n=8) and received for 16 weeks a synthetic diet, adequate with respect to all essential nutrients, and with different source of fat (10%): sesame (S), sunflower (SF), fish (F), olive (O), coconut (C) oil or lard (L). Animal weight was determined every week, ingesta level daily and BP was determined every two weeks. The AP activities analysed fluorimetrically were: AlaAP, ArgAP, CysAP, pGluAP, GluAP and AspAP, assayed in both soluble (sol) and membrane-bound (MB) fractions. Serum concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and steroid hormones (testosterone, dihydrotestosterone and estradiol) were also measured.

Blood pressure and serum total cholesterol concentration decreased significantly in animals fed with the F and L diet, and were correlated positively in the SF group. Serum HDL cholesterol concentration was significantly higher in the O,L and C groups and S and F groups had lower level of triglycerides in serum. Testosterone level in serum increased significantly in L-fed animals, and decreased in O-fed animals.

In different tissues studied, significant differences in most of the aminopeptidases activities assayed are observed.

The present data suggest that several aminopeptidase activity in serum and different tissues of rat involved in metabolism of angiotensins, oxytocin, vasopressin and

TRH, may be modified depending on the fat used in the diet by reducing or increasing the life average of these peptides. This may have therapeutic importance in pathologies such as hypertension, atherosclerosis and infertility in which, AP activities may be involved.

Resumen

Múltiples factores nutricionales están relacionados con el control de la presión arterial (PA). Los ácidos grasos (AG) y sus derivados, como los eicosanoides, pueden influir sobre la PA y están implicados en las enfermedades cardiovasculares. Se ha comprobado como una dieta baja en grasa o con poca cantidad de AG saturados disminuye la PA, al contrario existe una relación positiva entre PA y consumo de AG saturados. Sin embargo, el efecto de los distintos tipos de grasas en la dieta aún no se conocen.

Cambios en la grasa dietética inducen cambios en la composición de AG de las membranas plasmáticas en cerebro y en tejidos periféricos. Esto afecta a la fluidez de membrana, síntesis de eicosanoides, actividades enzimáticas asociadas a membrana, con sus posibles repercusiones sobre la salud. Además, se ha sugerido que la composición de AG de la dieta influye sobre la función reproductora en varones, la composición fosfolipídica de membranas testiculares de rata, en el metabolismo de prostaglandinas y en la fertilidad.

El sistema renina angiotensina (SRA) es el principal regulador de la PA y de la homeostasis del agua. Las aminopeptidasas juegan una importante función en la regulación del SRA, y la liberación de oxitocina, vasopresina, y de la TRH.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de diferentes grasas dietéticas sobre distintas actividades aminopeptidasas, valores de PA e ingesta, niveles de colesterol, triglicéridos y hormonas sexuales.

Seis grupos de ratas macho de la raza wistar recibieron durante 16 semanas una dieta con todos los nutrientes esenciales pero con distinta fuente lipídica (10%); aceites de sésamo (S), girasol (SF), pescado (F), oliva (O), coco (C) y manteca de cerdo (L). El peso de los animales fue determinado semanalmente, los niveles de ingesta diariamente y cada dos semanas se midieron valores de PA y de frecuencia cardiaca (FC). Las actividades aminopeptidasas (AP) que se determinaron fluorimetricamente fueron AlaAP, ArgAP, CysAP, pGluAP, GluAP y AspAP solubles y unidas a membrana. También se determinaron las concentraciones séricas de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, y hormonas esteroideas (testosterona, dihidrotestosterona y estradiol).

Los niveles de PA y colesterol total sérico disminuyó significativamente en los animales alimentados con pescado y manteca de cerdo, obteniéndose además una correlación positiva entre colesterol y PA en el grupo de girasol. La concentración de colesterol-

HDL fue mayor en los grupos de oliva manteca y coco, y los triglicéridos disminuyeron en los grupos de sésamo y pescado. La testosterona sérica incrementó significativamente en los animales que consumieron manteca de cerdo y disminuyó en el grupo oliva. En los diferentes tejidos analizados, se alcanzaron diferencias significativas en la mayoría de las actividades AP determinadas.

Estos resultados podrían sugerir que actividades AP en suero y diferentes tejidos de rata implicadas en el metabolismo de angiotensinas, oxitocina, vasopresina y TRH, podrían ser modificadas dependiendo de la grasa utilizada en la dieta, al reducir o incrementar la vida media de estos péptidos. Esto podría tener importancia terapéutica en patologías como la hipertensión, la aterosclerosis o la infertilidad, funciones en las cuales están implicadas las AP.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

EFECTO DEL GRADO DE
SATURACIÓN DE ÁCIDOS
GRASOS EN LA DIETA SOBRE
DIFERENTES ACTIVIDADES
AMINOPEPTIDASAS SOLUBLES Y
UNIDAS A MEMBRANA EN SUERO,
TEJIDO NERVIOSO Y OTROS
TEJIDOS PERIFÉRICOS

ANA BELÉN SEGARRA ROBLES

tesis doctoral

Expreso mi más sincero agradecimiento a todo el personal docente e investigador del Área de Fisiología, por su colaboración y ayuda en el desarrollo de esta tesis. Y en especial atención a aquellos que la han dirigido; Dra. Isabel Prieto Gómez y Dr. Manuel Ramírez Sánchez.

Mis agradecimientos a los Dres. Felix Vargas, Francisco Vives, Francisco Alba, Esperanza Ortega, M^a Estrella Ruiz y Diego Franco por su inestimable ayuda durante todo el proceso experimental.

Indice

I INTRODUCCIÓN	6
1. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS	7
1.1. Clasificación	8
1.1.1. Exopeptidasas	9
1.1.2. Aminopeptidasas.....	12
- Alanina aminopeptidasa soluble	12
- Alanina aminopeptidasa microsomal.....	14
- Arginina aminopeptidasa soluble.....	16
- Arginina aminopeptidasa lisosomal	18
- Cistina aminopeptidasa	19
- Aspartato aminopeptidasa	21
- Glutamato aminopeptidasa	22
- Piroglutamato aminopeptidasa I	23
- Piroglutamato aminopeptidasa II	24
1.2. Determinación de la actividad aminopeptidasa.....	26
2. LÍPIDOS EN LA DIETA.....	28
2.1. Ácidos grasos. Constitución química y nomenclatura	29
2.2. Ácidos grasos en la dieta	31
2.3. Usos nutritivos de los lípidos. Digestión, absorción y transporte ...	32
2.4. Lípidos en la dieta y enfermedad cardiovascular.....	34
2.4.1. Influencia sobre el metabolismo lipídico	34
2.4.2. Influencia sobre la oxidación lipídica	40
2.4.3. Influencia sobre la trombogénesis	42
2.4.4. Influencia sobre la presión arterial (PA).....	43
3. HIPERTENSIÓN ARTERIAL	47
3.1. Regulación fisiológica de la PA	49
3.2. Sistema renina angiotensina aldosterona (SRA)	50
3.2.1. Componentes del SRA	50
3.2.2. Mecanismos fisiopatológicos del SRA.....	57
3.2.3. Sistemas renina angiotensina tisulares.....	58
3.3. Hipertensión arterial y aterosclerosis	60
3.4. Aminopeptidasas e hipertensión arterial	62
4. DIETA Y ESTEROIDES SEXUALES	66
4.1. Dieta, esteroides sexuales y fertilidad	67
4.2. Esteroides sexuales e hipertensión	68

4.2.1. Estrógenos, progestágenos e hipertensión	69
4.2.2. Andrógenos e hipertensión	71
II OBJETIVOS.....	73
1. OBJETIVOS	74
III MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. MATERIALES	76
2. MÉTODOS	81
2.1. Grupos experimentales y dietas	82
2.2. Obtención de las muestras	84
2.3. Preparación de las muestras	84
2.4. Determinación de colesterol y triglicéridos	84
2.5. Determinación de hormonas esteroideas	85
2.6. Determinaciones enzimáticas	86
2.7. Determinación de proteínas	87
2.8. Preparaciones histológicas de la aorta	88
2.9. Análisis estadístico	89
IV RESULTADOS	90
1. CAMBIOS EN LOS VALORES DE PESOS E INGESTA	91
2. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA	91
3. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS ANALIZADOS	92
4. CORTES HISTOLÓGICOS DE LA AORTA	92
5. CAMBIOS EN EL NIVEL DE PROTEÍNAS EN PLASMA	93
6. CAMBIOS EN LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS	93
7. TABLAS	97
- Valores medios de pesos corporales y de órganos (Tablas 6 y 7)	97
- Valores medios de ingesta de alimento (T. 8 y 9)	98
- Valores medios de ingesta de agua (T. 10)	99
- Valores medios de presión arterial y frecuencia cardiaca (T. 11 y 12)	100
- Valores medios de triglicéridos, colesterol y hormonas sexuales en plasma (T. 13)	101
- Valores medios de proteínas en plasma (T. 14)	102
- Valores medios de actividades aminopeptidasas: Plasma (T.15), corteza renal (T.16), médula renal (T.17), aorta (T.18), ventrículo (T.19), aurícula (T.20), testículo (T.21), corteza frontal (T.22), e hipotálamo (T.23)	102
- Actividad alanina aminopeptidasa (Tabla 24)	107
- Actividad arginina aminopeptidasa (T. 25)	108
- Actividad cistina aminopeptidasa (T. 26)	109
- Actividad glutamato aminopeptidasa (T. 27)	110

- Actividad aspartato aminopeptidasa (T. 28)	111
- Actividad piroglutamato aminopeptidasa (T. 29)	112
- Correlaciones (T. 30-32)	113
V DISCUSIÓN	114
1. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE PESOS E INGESTA	115
2. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA	115
3. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE LOS PARÁMETROS ANALIZADOS EN PLASMA	116
4. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE AMINOPEPTIDASAS	119
4.1. Actividad aminopeptidasa en plasma	119
4.2. Actividad aminopeptidasa en riñón	119
4.3. Actividad aminopeptidasa en aorta	122
4.4. Actividad aminopeptidasa en corazón	124
4.5. Actividad aminopeptidasa en testículo	127
4.6. Actividad aminopeptidasa en tejido nervioso	130
5. GRÁFICAS	136
- Valores medios de pesos corporales y de hígado (Gráficas 1 y 2). ...	136
- Valores medios de ingesta de alimento y agua (G. 3 y 4)	137
- Valores medios de presión arterial y frecuencia cardiaca (G.5 y 6) ..	138
- Valores de presión arterial e ingesta de agua durante el experimento (G. 7 y 8).	139
- Valores medios de triglicéridos y colesterol total (G.9 y 10)	140
- Valores medios de colesterol-HDL y colesterol-LDL (G.11,12 y 13) .	141
- Valores medios de esteroides sexuales (G.14-18)	142
- Valores medios de proteína en plasma (G.19)	145
- Valores medios de actividades AP en: Plasma (G.20), corteza renal (G.21), médula renal (G.22), aorta (G.23), aurícula (G.24), ventrículo (G.25), testículo (G.26), corteza frontal (G.27), e hipotálamo (G.28).	145
VI CONCLUSIONES	154
1. CONCLUSIONES	155
VII BIBLIOGRAFÍA	159
1. BIBLIOGRAFÍA	160

I. Introducción

1. Enzimas Proteolíticos

1. ENZIMAS PROTEOLÍTICOS

1.1 Clasificación

Los enzimas proteolíticos, también llamados proteasas, proteinasas, o peptidasas, son aquellos enzimas encargados de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas (el término de peptidasas se refiere preferentemente a los enzimas que hidrolizan péptidos de menor tamaño).

Según la clasificación de la Unión Internacional de Bioquímica (Herrera 1991), estos enzimas pertenecen a la clase 3, debido a su actividad hidrolasa, y más concretamente a la subclase 3.4, que engloba a todas las hidrolasas de péptidos. Pueden dividirse en dos grandes grupos, las exopeptidasas y las endopeptidasas. Las primeras hidrolizan enlaces próximos a los extremos de la cadena polipeptídica, mientras que las endopeptidasas actúan sobre enlaces distantes a los extremos. Sin embargo, debido a la compleja especificidad de estos enzimas, incluyendo en algunos casos actividad exo y endopeptidasa (Singh y Kalnitsky 1980), y en otros su pertenencia a complejos multicatalíticos (Tsukahara y cols. 1988) deberíamos referirnos a que un enzima tiene una u otra actividad proteasa, más que a que sea una determinada proteinasa. Nosotros utilizaremos indistintamente una u otra terminología aún siendo conscientes de este problema de nomenclatura.

La Unión Internacional de Bioquímica clasifica a los enzimas proteolíticos en 4 clases o familias por comparación de sus centros activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional. Los enzimas proteolíticos actualmente aislados e identificados, de los que aún no se conoce su naturaleza y forma de actuación, son incluidos en un quinto grupo de proteinasas no clasificadas (Barret 1977):

- **Serina-proteinasa;** contienen al menos un resto de serina en su centro activo y son inhibidas específicamente por diisopropilfosfofluoridato. Entre las más conocidas citaremos la kalicreína, la enterokinasa, elastasa, tripsina, y quimiotripsina.
- **Cisteína-proteinasa;** se caracterizan por poseer un grupo tiol (-SH) en su centro activo, por ser inhibidas por 4-cloromercuribenzoato y activadas por dithiothreitol. Entre ellas se encuentran la catepsina B, la catepsina H, y las calpaínas.

- **Aspártico-proteinasas;** poseen un grupo carboxílico en su centro activo y son inhibidas por pepstatina. Como ejemplos más conocidos citamos la catepsina D, renina, y pepsina.
- **Metalo-proteinasas;** se caracterizan por contener un ión metálico (en la mayoría de los casos Zn^{++}) en su centro activo. Inhibidas por EDTA y fenantrolina. Encontramos entre ellas las carboxipeptidasas A y B, y la aminopeptidasa M.
- **Proteinasas no clasificadas;** incluyen enzimas proteolíticos de mecanismo catalítico desconocido, tales como las colagenasas, ciertas aminopeptidasas y las peptidasas señal.

1.1.1. Exopeptidasas

Las exopeptidasas son enzimas hidrolíticos cuya acción se limita a uno u otro terminal de la cadena polipeptídica. Su clasificación atiende a la especificidad que muestren por un sustrato determinado, asignándosele un nombre convencional que indica si el extremo frente al que son activos es el grupo carboxilo o el α -amino, e indicando también el tamaño del fragmento liberado.

Las exopeptidasas que requieren un grupo α -amino libre se denominan **aminopeptidasas** (AP) si liberan aminoácidos individualmente, dipeptidil aminopeptidasas si liberan dipéptidos intactos, y tripeptidil aminopeptidasas si liberan tripéptidos enteros.

Las exopeptidasas que requieren un grupo carboxílico terminal no sustituido de los péptidos se denominan **carboxipeptidasas** si liberan aminoácidos libres y dipeptidil carboxipeptidasas si liberan dipéptidos intactos.

Un tercer grupo de exopeptidasas son las denominadas **dipeptidasas** y **tripeptidasas** cuyo principal atributo común es su especificidad por sustratos que posean una determinada distancia (de dos o tres residuos aminoacídicos) entre el grupo α -amino libre y el grupo carboxilo libre. Esto da lugar a confusiones ya que ciertas dipeptidasas y tripeptidasas parecen afectar a cadenas polipeptídicas mayores (Coffey y De Duve 1968), y algunas aminopeptidasas pueden utilizar como sustratos a dipéptidos y tripéptidos de diversa naturaleza (Felgenhauer y Glenner 1966; Kania y cols. 1977).

Las ω **peptidasas** son una nueva clase de exopeptidasas capaces de separar residuos terminales que, o bien carecen de un grupo α -amino o α -carboxilo libre (por ejemplo: piroglutamil aminopeptidasa), o bien poseen un enlace que afecta a un grupo carboxílico o amino no unido a un carbono α (por ejemplo: γ -glutamil aminopeptidasa).

Los nombres dados a la mayoría de las AP se basan frecuentemente en sus preferencias o requerimientos por un particular aminoácido N-terminal. Por ejemplo, un enzima que muestre su más alta tasa de hidrólisis sobre enlaces de alanina N-terminal se denominaría alanil aminopeptidasa. Similarmente, los nombres aplicados

a las carboxipeptidasas que liberan aminoácidos simples sirven para identificar sus requerimientos o preferencias por un residuo C-terminal.

En lo que se refiere a la localización subcelular de las exopeptidasas, se pueden aplicar los criterios seguidos para las proteínas en general. Se consideran **exopeptidasas solubles** a aquellas obtenidas en disolución tras homogeneización y ultracentrifugación de un tejido en un medio hipotónico. Tal fracción contiene a su vez a los enzimas citosólicos (extraíbles tras ultracentrifugación en medio isotónico) y a los contenidos en orgánulos intracelulares. Por otra parte, cuando el precipitado resultante del caso anterior se resuspende en un medio que contiene sustancias con carácter detergente y nuevamente ultracentrifugamos, obtenemos la **fracción enzimática unida a membrana**. Hemos de tener en cuenta, que tales exopeptidasas pueden ser originarias de cualquier tipo de membrana celular incluyendo los orgánulos subcelulares, adicionalmente pueden obtenerse subfracciones de las anteriores separaciones (exopeptidasas lisosomales, de membrana plasmática, mitocondriales, etc.) obteniendo las distintas fracciones por centrifugación en gradiente de concentración.

Las **exopeptidasas citosólicas** se encuentran entre las primeras proteasas en ser descubiertas (McDonald y Barrett 1986). La fuente original de muchas exopeptidasas fueron las preparaciones de mucosa intestinal, donde se comprobó que existía una mezcla compleja de enzimas de diversa especificidad. Entre ellas se describieron distintas **dipeptidasas** y la **leucil aminopeptidasa**, primer ejemplo de exopeptidasa N-terminal conocido (Linderstrom-Lang 1929). Simultáneamente (McDonald y Barrett 1986), se descubrió en páncreas de buey una proteasa que separaba aminoácidos del extremo C-terminal de los péptidos. A este enzima se le denominó **carboxipeptidasa**. Veintisiete años más tarde (Folk 1956), se describió otra carboxipeptidasa pancreática que mostraba preferencia casi absoluta por aminoácidos básicos. Esta última es denominada actualmente carboxipeptidasa B, y la primera, carboxipeptidasa A. Ambas se segregan como zimógenos (procarboxipeptidasas) activables por tripsina.

Tras el descubrimiento de las AP de origen intestinal se encontró que el riñón era una fuente aún más abundante de actividad aminopeptidásica (Spackman y cols. 1955), al igual que el cristalino y la pulpa dental. En 1966, Hopsu y colaboradores detectaron en los extractos de hígado de rata una nueva AP citosólica dependiente de iones cloro y sulfhidrilos que fue denominada **aminopeptidasa B** (AP B) (arginil aminopeptidasa (ArgAP)) debido a su estricta especificidad por residuos de arginina y lisina de péptidos y derivados de la naftilamida, pareciendo ser la contrapartida de la carboxipeptidasa B. La denominada **alanina aminopeptidasa** (AlaAP) fue descubierta en hígado, y resultó ser dependiente de cobalto y sensible a la puromicina (Behal y cols. 1966), pero su especificidad de sustrato contrastaba con la de la AP B en que la mayoría de los residuos N-terminales de los péptidos eran sensibles a su acción, aunque la alanina era el residuo preferido. Por otro lado, Cheung y Cushman en 1971 identificaron una nueva AP en riñón específica para los residuos aspártico y glutámico N-terminales. A este enzima se le dio el nombre de **aspartato aminopeptidasa** (AspAP).

La actividad de dipeptidil aminopeptidasa citosólica fue inicialmente detectada en extractos de la hipófisis y denominada **dipeptidil aminopeptidasa III** (DAP III) (Ellis y Nuenke 1967). El enzima, de pH óptimo básico, se determinaba fácilmente utilizando Arg-Arg-2-naftilamida a pH 9 y catalizaba la separación de dipéptidos N-terminales. Se ha descrito incluso una **tripeptidil aminopeptidasa** (Bälow y cols. 1983) en citosol hepático que cataliza la liberación de tripéptidos N-terminales, y una **prolil aminopeptidasa** específica para residuos de prolina N-terminales (Nordwig y Mayer 1973).

Curiosamente, no se han encontrado carboxipeptidasas citosólicas aunque si existen dipeptidasas citosólicas que afectan a la prolina (McDonald y Barrett 1986).

Las **membranas celulares** contienen exopeptidasas de todo tipo y la mayoría de ellas fueron inicialmente descritas a partir de extractos renales. La **aminopeptidasa A** (AP A) (glutamato aminopeptidasa (GluAP)) es relativamente específica para aminoácidos dicarboxílicos N-terminales (Glenner y cols. 1962). El nombre de GluAP se debe a su preferencia por este aminoácido, a diferencia de su homóloga citosólica que prefiere aspartato.

La **aminopeptidasa M** (AP M) sería la contrapartida unida a membrana de la AlaAP citosólica con un amplio rango de acción sobre los aminoácidos neutros N-terminales.

También se ha descrito una **dipeptidil aminopeptidasa** (DAP IV) asociada a las membranas (Hopsu-Havu y Glenner 1966), que separa dipéptidos del extremo N-terminal siempre que el segundo aminoácido sea prolina, e incluso una dipeptidasa asociada a las membranas de las células renales (Robinson y cols. 1953).

Se conoce la existencia de al menos dos **carboxipeptidasas** unidas a membrana. La primera en descubrirse fue el **enzima convertidor de angiotensina** (ECA) (dipeptidil carboxipeptidasa A) que, aunque inicialmente fue descrita en plasma (Skeggs y cols. 1956), hoy se sabe que se encuentra distribuida por casi todos los tejidos. Es una metalopeptidasa con una especificidad relativamente amplia y capaz de transformar angiotensina I en angiotensina II. El segundo enzima es la **carboxipeptidasa P** (Dehm y Nordwig 1970) que prefiere separar dipéptidos con residuos de prolina en penúltima posición.

A nivel **lisosomal** se ha podido demostrar que algunas catepsinas son realmente exopeptidasas y no endopeptidasas. Sólo se ha purificado una AP a este nivel (Kirschke y cols. 1977), dicho enzima es una cistinil-proteinasa que junto a su capacidad proteinasa posee actividad aminopeptidasa. Por ello se la ha calificado de **endoaminopeptidasa**. Actualmente se le denomina **catepsina H** o Arginina aminopeptidasa lisosomal (McDermott y cols. 1988).

La existencia de dos **dipeptidil aminopeptidasas lisosomales** sí está perfectamente determinada. La primera de ellas, dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I) fue descrita por McDonald y colaboradores (1966) en extractos hipofisarios y posee una amplia especificidad a pH óptimo ácido. Curiosamente se ha demostrado con posterioridad que la DAP I se correspondía con la catepsina C previamente descrita (McDonald y cols. 1969).

La segunda dipeptidil aminopeptidasa (DAP II), también de origen lisosomal, presenta una especificidad distinta y complementaria a la anterior, pues hidroliza enlaces peptídicos perfectamente diferenciables de los sensibles a la DAP I.

Se han descrito tres **carboxipeptidasas** a nivel lisosomal. La primera resultó ser la descrita como catepsina A previamente (Iodice 1967), de propiedades muy parecidas a la carboxipeptidasa A pancreática. La segunda (Fruton y Bergmann 1939), que requiere grupos sulfhidrúlicos, parece inseparable de la actividad proteinásica de la catepsina B. La tercera, a veces denominada **carboxipeptidasa C**, libera aminoácidos C-terminales de péptidos cuyo penúltimo residuo es la prolina.

También se ha descrito una **tripeptidil aminopeptidasa** (Doebber y cols. 1978) y una dipeptidasa (McDonald y cols. 1972) de origen lisosomal y por tanto, como en todos los casos anteriores, de pH óptimo ácido.

Se han encontrado representantes del grupo de las ω -**peptidasas** en las tres localizaciones subcelulares previamente reseñadas (citosol, membrana y lisosomas). La γ -**glutamil aminopeptidasa** (γ -GluAP) es un enzima unido a membrana que cataliza tanto la hidrólisis como la transferencia de residuos γ -glutamilos N-terminales (el glutatión sería, por ejemplo, un sustrato de este enzima) (Orlowsky y Meister 1965).

La actividad de **piroglutamato aminopeptidasa** (pGluAP) se encuentra tanto en el citosol como unida a las membranas celulares, y es capaz de liberar específicamente residuos piroglutamilos del extremo N-terminal de los polipéptidos a pH 7,5, sin afectar al resto de los enlaces peptídicos de la cadena (Armentrout 1969).

Finalmente, se ha descrito una γ -**glutamil carboxipeptidasa** a nivel lisosomal que libera residuos γ -glutamilos del extremo C-terminal de los péptidos (Hoffbrand y Peters 1969).

1.1.2. Aminopeptidasas

ALANINA AMINOPEPTIDASA SOLUBLE

Número: E.C.- 3.4.11.14.

Nombre e historia: Se han descrito gran número de tejidos animales que poseen actividad aminopeptidásica citosólica sensible a la puromicina, pero la mayoría de los trabajos realizados con esta actividad se han hecho con enzimas cerebrales, las cuales han sido implicadas en el metabolismo de las encefalinas (De Souza y cols. 1991; Hersh y McKelvy 1981; Mc Dermott y cols. 1985; Hui y cols. 1983; Smyth y O'Cuinn 1994).

En la literatura se usan otras denominaciones para este enzima; alanil aminopeptidasa (Flores y cols. 1996), aminopeptidasa que degrada encefalina,

aminopeptidasa que degrada neuropéptidos (McDermott y cols. 1985), aminopeptidasa III (Sharma y Ortwerth 1996), tiol aminopeptidasa y aminopeptidasa sensible a puromicina o AP PS (Dando y cols. 1997).

Distribución: La Alanina Aminopeptidasa soluble (AlaAPsol) es muy abundante en cerebro de roedores, siendo menos abundante en intestino delgado, músculo esquelético, testículos y otros tejidos (Hiroi y cols. 1992; Constam y cols. 1995; Dando y cols. 1997). Tobler y colaboradores en 1997, describen una distribución similar para el enzima humano. Además de en cerebro, la AlaAPsol. se ha encontrado en músculo esquelético humano (Mantle 1992), cristalino humano (Sharma y Ortwerth 1986) e hígado de rata (Hiroi y cols. 1992).

Este enzima posee una amplia distribución en las especies animales. La mayoría de la actividad circulante se cree que procede del hígado, mientras que la actividad encontrada en orina, parece que tiene su origen en el riñón. Subcelularmente, se localiza en la fracción soluble, aunque se ha postulado que parte de la actividad puede ser lisosomal o estar asociada a otros componentes subcelulares (Barret y cols, 1998).

Sustrato Artificial: alanil- β -naftilamida (Ala- β -NA).

Propiedades Moleculares: Este enzima, procedente de ratón, fue clonado por Constam y cols. (1995) y el enzima humano ha sido clonado por Tobler y cols. (1997). La identidad de secuencia entre las especies es de un 98%. Es una metalopeptidasa de cadena proteica simple de 100 Kda. (Dando y cols. 1997).

Extremadamente sensible a la puromicina, que ejerce sobre ella una inhibición de tipo competitivo. También es inhibida por la bestatina y el EDTA. Su pH óptimo es de 6,7-7,4. Requiere la presencia de DTT (dithiothreitol) para su activación y estabilización.

Función fisiológica: Cataliza la liberación de aminoácidos N-terminales de dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos y diferentes aminoacil- β -naftilamidas, con preferencia por derivados de la alanina, metionina, fenilalanina, leucina, arginina y tirosina. Tiene su máxima actividad a pH 7,5 y es activada por tiol e iones calcio (Mantle y cols. 1983; Dando y cols. 1997). Compuestos con Prolina en posición N-terminal son resistentes a la hidrólisis por alanina aminopeptidasa por lo que no afecta a la bradikina (Hiroi y cols. 1992; Smyth y O'Cuinn 1994; Dando y cols. 1997).

Las funciones fisiológicas de la Alanina Aminopeptidasa soluble son bien conocidas. La localización predominantemente citosólica de este enzima podría no estar de acuerdo con un importante papel en la degradación de péptidos bioactivos extracelulares. Su amplia distribución en tejidos de ratas también sería un argumento en contra de un efecto puramente regulador de neuropéptidos. Constam y colaboradores en 1995 sugirieron que este enzima podría participar en procesos proteolíticos esenciales para el crecimiento y viabilidad celular. Hiroi y colaboradores en 1992 indicaron que la degradación de hemoglobina acetilada por una endopeptidasa neutra purificada de hígado de rata, era estimulada significativamente por la adición de Alanina Aminopeptidasa soluble, la cual por si misma no poseía

esta actividad proteolítica. Ellos especularon que el paso limitante en la degradación *in vivo* de proteínas estables podría ser una hidrólisis llevada a cabo por la aminopeptidasa que expondría un residuo desestabilizado a la posterior actividad degradativa (Bachmair y cols. 1986).

Se cree que el turn-over de proteínas intracelulares es mediado en primer lugar por el proteasoma (Coux y col 1996), dando lugar a la formación de una gran cantidad de oligopeptidos, incluyendo peptidos antigénicos presentes en la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. La mayoría de estos péptidos son posiblemente degradados a aminoácidos por la acción de exo y endopeptidasas citosólicas, incluyendo la AlaAPsol. La AlaAPsol podría ser perfectamente la aminopeptidasa citosólica más importante en células de mamífero (Mantle 1992).

Comentario: Sus niveles séricos están elevados en ciertas patologías, como adenocarcinoma de colon y páncreas, síndrome nefrótico y embarazo (McDonald y Barrett 1986). Se confunde fácilmente con la leucil aminopeptidasa sobre todo cuando se utiliza Leu- β -Nnap como sustrato, aunque se sabe que son dos enzimas distintos. Puede también confundirse con la alanil aminopeptidasa unida a membrana, con la que posee muchas propiedades en común.

ALANINA AMINOPEPTIDASA MICROSOMAL

Número: E.C.- 3.4.11.2.

Nombre e historia: El enzima fue denominado en sus comienzos como AP M, debido a su localización microsomal o de membrana, reflejando de esta forma su firme asociación con la fracción de membrana microsomal en riñón de cerdo a partir del cual fue purificado. Hoy en día aún se puede encontrar ocasionalmente esta nomenclatura en la bibliografía e incluso ha sido confundida con la leucina aminopeptidasa citosólica, a causa de la coincidencia en el sustrato específico y de su distribución tisular similar.

En 1980 se sugirió que el enzima se podría renombrar como AP N, debido a su preferencia de acción sobre aminoácidos neutros (Feracci y Maroux 1980), siendo esta terminología todavía de uso común.

El nombre de alanina aminopeptidasa de membrana (AlaAPmb) fue introducido para clarificar la naturaleza y localización del enzima y para distinguirlo de su equivalente citosólico.

Muchas de las caracterizaciones originales de la alanina aminopeptidasa de membrana se realizaron con enzimas renales o intestinales. Sin embargo, la presencia del enzima en el cerebro ha provocado un importante interés desde el descubrimiento de su participación en la hidrólisis e inactivación de las encefalinas (Gros y cols. 1985; Matsas y cols. 1985).

Distribución: Se encuentra ampliamente distribuida en muchas especies y tejidos, aunque se puede encontrar de forma muy abundante en la membrana de borde de

cepillo del túbulo contorneado proximal del riñón, células de la mucosa del intestino delgado y en el hígado. También está presente en el pulmón donde es idéntico al "antígeno p146 tipo II de las células del epitelio alveolar" (Funkhouser y cols. 1991) y está localizado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. En las células epiteliales polarizadas, la AlaAPmb está localizada en el dominio apical y es blanco de una señal que se cree que está situada en el centro de la región catalítica de la proteína (Vogel y cols. 1992).

Además de estar presente en células endoteliales y membrana sinápticas, se ha localizado en astrocitos y pericitos (Barnes y cols. 1994; Kunz y cols. 1994).

Sustratos Artificiales: Ala- β -NA, Leu- β -NA.

Propiedades Moleculares: Proteína integral de membrana tipo II de peso molecular de 280.000 Daltons localizada sobre la membrana plasmática como un ectoenzima. Constituida por dos subunidades idénticas que contienen un átomo de Zn^{2+} y un 20% de carbohidratos. Es inhibida por la 1-10-fenentrolina y la bestatina, pero en menor medida que por la amastatina o probestina (Tieku y Hooper 1992).

Función fisiológica: Cataliza la hidrólisis de aminoácidos N-terminales no sustituidos de péptidos. Muestra preferencia por residuos neutros. En el intestino delgado se encuentra localizado en alta concentración en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales, y se considera que juega un papel fundamental en los estadios finales de la digestión y absorción de proteínas (Barret y cols, 1998).

En el riñón, contribuye al catabolismo extracelular del glutatión (Curthoys 1987). La cisteinil-glicina generada durante el catabolismo del glutatión por la γ -glutamyl-transpeptidasa es hidrolizada por dos ectoenzimas, la Alanina aminopeptidasa de membrana y la dipeptidasa de membrana, contribuyendo aproximadamente de igual forma cada una de ellas (McIntyre y Curthoys 1982).

En el intestino, el enzima actúa en la etapa final de la digestión de péptidos y proteínas. Se ha llevado a cabo una detallada localización del enzima en el cerebro, debido a su potencial papel en la inactivación de ciertos neuropéptidos, especialmente encefalinas (Solhonne y cols. 1987; Barnes y cols. 1988, 1994).

Es abundante en el plexo coroideo y puede también por lo tanto servir para impedir la entrada al cerebro de péptidos circulatorios dañinos. En células vasculares, puede servir para metabolizar ciertos péptidos vasoactivos como la angiotensina III (Ward y cols. 1990).

Una importante localización de la AlaAP memb está en las células hematopoyéticas, donde se relaciona con las células CD13 (Look y cols. 1989). Aquí, su expresión está restringida primordialmente a células mieloides, pero también ha sido encontrada en células presentadoras de antígeno, células del melanoma y linfocitos. Su función más frecuente, en el sistema inmune, es inactivar ciertas citoquinas (Hoffman y cols. 1993; Kanayama y cols. 1995). La actividad antitumoral e inmunopotencial descrita para la bestatina puede relacionarse con la inhibición de la Alanina aminopeptidasa de membrana (Leyhausen y cols. 1983).

Otra función fisiológica atribuida a este enzima corresponde con un nuevo papel como receptor para ciertos virus, especialmente para coronavirus 229E, virus ARN que causa infecciones en el tracto respiratorio alto de humanos (Yeager y cols. 1992). Estudios de mutagénesis sugieren que el sitio de unión al virus se localiza cerca de la región activa, aunque la actividad del enzima no es esencial para la unión del virus. La Alanina aminopeptidasa de membrana humana también parece mediar la infección de citomegalovirus en humanos, aunque de nuevo la actividad del enzima no es esencial para la infección (Soderberg y cols. 1993). Otro coronavirus, el virus de la gastroenteritis transmisible, que causa una diarrea fatal en cerdos recién nacidos, usa el enzima intestinal como receptor (Delmas y cols. 1992).

La sustancia P y la bradiginina, las cuales no son sustratos de la Alanina aminopeptidasa de membrana, han sido descritas como inhibidores naturales del enzima (Xu y cols. 1995).

Sin embargo, es improbable que la bradiginina y la sustancia P jueguen un papel fisiológico en la regulación del enzima.

ARGININA AMINOPEPTIDASA SOLUBLE

Número E.C: 3.4.11.6.

Nombre e historia: Esta actividad exopeptidasa fue originalmente identificada en muchos tejidos de rata usando L-aminoacil- β -naftilamida y L-aminoacid-7-amido-4-metilcumarina como sustratos. Este enzima sólo puede separar residuos básicos (Arg y Lys) de L-aminoacil- β -naftilamida por lo que fue consecuentemente denominado AP B (Barret y cols, 1998).

El nivel de actividad aumenta en presencia de concentraciones fisiológicas de cloruro. Además, posee capacidad para convertir la lisilbradiginina (kalidina-10) a bradiginina aunque estos resultados han sido discutidos (Kawata y cols. 1980; Söderling 1983). Esta actividad no parece capaz de hidrolizar la unión Arg-Pro de la bradiginina.

Se ha descrito que la arginil aminopeptidasa soluble (ArgAPsol) también posee actividad endopeptidasa (Söderlin y Mäkinen 1983; McDermott y cols. 1988).

Este enzima ha sido considerado como una Zn^{2+} metalo peptidasa o como una tior proteasa. Aunque muchos autores describen el Pm de la ArgAPsol alrededor de 70.000 Daltons (Mantle y cols. 1985; Ishiura y cols. 1987; Flores y cols. 1993; Belhacene y cols. 1993; Yamada y cols. 1994), otros autores describen proteínas con pesos en un rango que oscila desde 43.000 hasta 105.000 Daltons (Söderling y Mäkinen 1983).

Ha sido también llamada AP B, arilamidasa II, arginina aminopeptidasa, arginina aminopeptidasa cloruro activada y citosol aminopeptidasa IV. Durante un tiempo se sospechó la posibilidad de que fuese idéntica a la Leucotrieno A_4 hidrolasa o bleonin hidrolasa, sin embargo, es claramente distinta.

Distribución: Enzima citosólico, ampliamente distribuido en células y tejidos de mamíferos. Está presente en muchos tejidos de rata (corteza, corazón, riñón, intestino grueso, pulmón, músculo, páncreas, intestino delgado) (Foulon y cols. 1996), también se ha descrito en las vesículas secretoras de la hipófisis (Gainer y cols. 1984) y en varias líneas celulares, indicando que el enzima posee una distribución ubicua, aunque la ArgAPsol fue expresada de forma diferente en todos estos ejemplos. En testículo, la ArgAP sol se expresa mayoritariamente durante la fase de maduración en las espermátides tardías.

Sustrato Artificial: arginil- β -naftilamida (Arg- β -NA).

Propiedades Moleculares: Metaloenzima con un peso molecular de 72300 Daltons, típicamente activada por iones Cl^- . Constituido por un tetrámero capaz de escindirse en dos dímeros activos, con un residuo de Cys en el centro activo. Es inhibido competitivamente por la bestatina, pero no por puromicina ni por amastatina. su pH óptimo es 7 (Kawata y cols. 1980).

Función fisiológica: Cataliza específicamente la hidrólisis de residuos N-terminales Arg- y Lys- de péptidos y derivados de la β -naftilamida.

La observación de la sección de los túbulos seminíferos demostraron que este enzima está concentrado en el citoplasma de las espermátides tardías, las cuales dan lugar a los cuerpos residuales. Mediante microscopía confocal se obtuvieron evidencias de su presencia en áreas intersticiales de los túbulos seminíferos, sugiriendo que puede también expresarse en células de Leydig (Foulon y cols. 1997).

El examen, mediante microscopía electrónica, de la localización subcelular de la arginil aminopeptidasa soluble en células germinales, demostró su presencia en el aparato de Golgi, alrededor del polo apical del núcleo de la espermátida, y que está concentrada en los gránulos proacrosómicos de esas células. A partir del conocimiento de que el acrosoma es generado en los sáculos del aparato de Golgi, esto confirmó su presencia en el aparato secretor de las espermátidas durante su transformación a espermatozoos.

En un principio se pensaba que era citosoluble pero también puede ser secretada. Se ha encontrado en cultivos de células hipofisarias del lóbulo intermedio (Castro y cols. 1989), de linfocitos T (Belhacene y cols. 1993), células germinales y células PC12. Además, el enzima fue encontrado asociado con la membrana de vesículas secretoras de la hipófisis (Gainer y cols. 1984) y en parte de la superficie de membrana de las células PC12.

Es interesante que la actividad de la ArgAPsol se disregula durante la activación a largo plazo de los linfocitos T normales y linfocitos T leucémicos mediante varios estímulos (Belhacene y cols. 1993). En el caso de las células PC 12 la unión indica una asociación de la ArgAPsol a la membrana, la cual es observada solo en 1/5 parte de las células.

La cercana relación estructural entre la arginil aminopeptidasa soluble y la LTA_4 hidrolasa es ilustrada por la capacidad del enzima para hidrolizar *in vitro* el leucotrieno LTA_4 a LTB_4 , la cual es un mediador lipídico de la inflamación. En este momento, la

importancia fisiológica de la bifuncionalidad *in vitro* de la arginil aminopeptidasa soluble sigue siendo una cuestión sin cerrar. La gran dependencia del enzima de su pH y la presencia ubicua de ésta, argumentan a favor de su adaptabilidad a varios subcompartimentos celulares y su involucración en un amplio espectro de fenómenos fisiológicos, incluyendo procesos inflamatorios en los cuales algunos péptidos, potenciales sustratos del enzima, como la lisilbradicinina, encefalinas o somatostatina, pueden jugar un papel central. Además, puede estar asociada con procesos reguladores a varios niveles de red de membrana de la producción celular. Esto puede incluir otros procesos de postmaduración en la red trans Golgi y/o regulación de procesos en la membrana plasmática (Barret y cols. 1998).

ARGININA AMINOPEPTIDASA LISOSOMAL

Número: E.C.- 3.4.22.16. Es la catepsina H, una "endoaminopeptidasa". Se incluye aquí por su fuerte actividad aminopeptidásica.

Nombre e historia: El nombre de catepsina H fue dado a una peptidasa lisosomal llamada primeramente L20C21, y luego catepsina B₃ por su similitud con la catepsina B, entonces conocida como catepsina B₁.

Actualmente se atribuye a la catepsina H las evidencias histoquímicas sobre la existencia de un enzima lisosomal tiol dependiente activo frente a la Leu-NH (Barret y cols. 1998).

En 1975 Davidson y Poole purificaron parcialmente un enzima de lisosomas de hígado de rata, pero diferente de la catepsina B. Este enzima obviamente era la catepsina H.

En piel de ratas se ha aislado una hidrolasa identificada, por métodos inmunológicos, como la catepsina H (Rinne y cols. 1985). De pulmón de conejo se ha aislado una benzoilarginina-β-Naftilamida hidrolasa que fue descrita como degradadora de colágeno (Singh y Kalnitsky 1980) y posteriormente denominada catepsina I (Kalnitsky y cols. 1983). En trabajos posteriores, preparaciones de este enzima de pulmón de conejo y de rata no demostraron actividad colagenolítica, pero demostraron alta reactividad cruzada con un anticuerpo frente a la catepsina H de hígado de rata (Kirschke y cols. 1986). No había, por lo tanto, razones para introducir el nombre de catepsina I para el enzima de pulmón de conejo.

Distribución: Está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos y su localización es lisosomal. La catepsina H parece estar ubicuamente distribuida en las células de mamíferos y demuestra tener una relación muy cercana con peptidasas de *Dictyostelium* y de plantas. Ha sido purificado a partir de tejidos de muchas especies y células tumorales. Especialmente, el riñón contiene una alta concentración del enzima (Kominami y cols. 1985). Se han descrito muchos métodos de purificación partiendo de la fracción lisosomal (Kirschke y cols.1977) o de extractos tisulares íntegros.

Sustrato Artificial: Arg- β -NA.

Propiedades Moleculares: Glicoproteína sintetizada como preproenzima de 335 aa; procatépsina H. Requiere DTT (dithiothreitol) para su completa actividad. Inhibidores son las cistatinas, alfa2-macroglobulina y antígenos de linfocitos citotóxicos de ratón CTLA-2B (Barrett y cols. 1986, Delaria y cols. 1994).

Función fisiológica: Libera aminoácidos N-terminales de sustratos sintéticos y péptidos. A pH 6 exhibe gran preferencia por Arg-N-terminal; concretamente muestra el doble de actividad por Arg- que por Leu-. La actividad endopeptidásica de este enzima parece restringirse a sustratos pequeños y es generalmente débil frente a proteínas. Se inactiva irreversiblemente a pH 7 (Schwartz y Barrett 1980).

Se demostró que el interferón γ regula al alza la expresión del ARNm de la catepsina H (Lafuse y cols. 1995). Debido a que este incremento coincide a la vez con la presentación de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y con cambios en el ARNm en macrófagos, la catepsina H puede estar involucrado en procesos antigénicos. No se conoce otra función especial para la catepsina H, salvo su sobreexpresión en algunas enfermedades como cáncer y artritis. Esto sugiere que este enzima puede actuar en muchos procesos de degradación de proteínas en el compartimento lisosomal-endosomal como una aminopeptidasa con amplia especificidad por el sustrato.

El gen de la catepsina H humana se encuentra en el cromosoma 15q24-25. Se ha constatado que la estructura genética de la catepsina H de rata posee 12 exones de 17,5 kb (Ishidoh y cols, 1989).

CISTINA AMINOPEPTIDASA

Número E.C.: 3.4.11.3.

Nombre e historia: Desde que en 1930 se descubriera la capacidad del suero de mujer embarazada para degradar oxitocina, muchos investigadores han estudiado este enzima. Es una aminopeptidasa con especificidad por las uniones peptídicas entre la cisteína N terminal y el residuo tirosina adyacente de la oxitocina o vasopresina, por lo que desde entonces se ha llamado oxitocinasa o vasopresinasa.

Tuppy y Nesbada (1957) introdujeron un método químico para la determinación de este enzima usando un sustrato sintético, la L-Cys- di NHNap. Por eso este enzima es también llamado cistina aminopeptidasa y cistinil aminopeptidasa.

La leucina aminopeptidasa de placenta (P-LAP), la cual se incrementa en suero durante el embarazo, fue purificada a partir de suero retroplacentar usando un sustrato sintético, L-Leu-NHPhNO₂ y demostró ser idéntica a la cistinil aminopeptidasa (Tsujiyamoto y cols. 1992).

El ADNc humano para este enzima fue el primero clonado después de la determinación de la secuencia parcial de aminoácidos del enzima purificado (Rogi y cols. 1996).

Una nueva aminopeptidasa regulada por insulina a partir de vesículas GLUT4, ha sido clonada independientemente a partir de adipocitos de rata (Keller y cols. 1995).

Distribución: Se ha localizado sólo en el plasma de mujeres embarazadas y en la placenta humana y de otros primates. sin embargo, el suero fetal y el fluido amniótico están libres de esta actividad enzimática. Aunque históricamente se sabe que el enzima se encuentra en plasma de embarazadas y placenta de humanos y primates, la presencia del enzima en hipotálamo de animales también ha sido descrita (Barret y cols. 1998).

Solo se puede detectar una pequeña cantidad de enzima en sangre de mujeres no embarazadas y nada en sangre de hombres. El análisis mediante Northern blot demostró que la oxitocinasa humana no solo es expresada en placenta, sino que también lo hace en muchos tejidos incluyendo corazón, músculo esquelético y cerebro. Se expresan 2 formas de ARNm (transcriptores de 3,6 y 10,5 Kb) (Rogi y cols. 1996).

Sustrato Artificial: cistinil- β -naftilamida (Cys- β -NA).

Propiedades Moleculares: Es una glicoproteína de peso molecular 280.000 D, constituida por dos subunidades idénticas conteniendo cada una dos átomos de zinc. Es insensible a la bestatina y a aminoácidos hidrofóbicos, a diferencia de otras aminopeptidasas séricas.

Función fisiológica: Hidroliza los enlaces peptídicos entre una cistina N-terminal y el residuo adyacente. En el caso de la oxitocina, su presunto sustrato fisiológico, el residuo adyacente es la tirosina. Por la acción de este enzima se destruye la actividad biológica de esta hormona de la neurohipófisis. Exhibe una amplia especificidad sobre diferentes aminoacil- β -naftilamidas.

Durante el embarazo la placenta libera oxitocinasa a la circulación materna. Sin embargo, el mecanismo de esta liberación es todavía desconocido. Mientras la actividad enzimática en el suero permanece baja durante el primer trimestre, aumenta progresivamente durante el segundo y tercer trimestre para alcanzar el máximo alrededor del término del embarazo, descendiendo entonces a partir del parto (Mizutami y cols. 1976).

La oxitocinasa hidroliza *in vitro* a la oxitocina y a la vasopresina. Los fetos producen esos factores activamente mientras progresa el embarazo o durante acidemia fetal y en ellos actúan como agentes uterotónicos y vasoactivos, respectivamente. Se piensa que la oxitocinasa de la sangre de embarazadas sirve para prevenir contracciones uterinas prematuras mediante la degradación de la oxitocina. El enzima también juega un importante papel en el control de la presión sanguínea de la madre y del feto a través de la regulación de la concentración de péptidos vasoactivos en la interfase entre el feto y la madre. De hecho, monitorizar los cambios en la actividad de la oxitocinasa materna es útil para predecir el parto y el parto prematuro (Naruki y cols. 1995) y predecir la preeclampsia (un desorden hipertensivo peculiar de los embarazos) (Mizutani y cols. 1985).

Recientemente se ha demostrado que la oxitocinasa degrada *in vitro* somatostatina (Mizutani y cols. 1996). Ya que la somatostatina interviene en el crecimiento del feto regulando la secreción de insulina y de hormona del crecimiento, hay datos que sugieren que el enzima puede estar involucrado en el crecimiento fetal mediante la degradación de somatostatina. La monitorización de la función feto-placentaria y del desarrollo fetal mediante "electrónica médica" tiene en gran medida que reemplazar el papel de los métodos bioquímicos, como el método de determinación de este enzima. No obstante, considerando todos los datos, el uso clínico del enzima todavía es prometedor.

ASPARTATO AMINOPEPTIDASA

Número: E.C.: 3.4.11.21.(Creado en el 2000)

Nombre e historia: A esta actividad enzimática se le ha denominado durante mucho tiempo como glutamato aminopeptidasa, ya que se creía que se trataba de un solo enzima con actividad sobre residuos asparticos y glutamicos (aminoácidos ácidos), pero se ha visto que son dos enzimas distintos con distintas propiedades (Kelly y cols. 1983).

La aspartato aminopeptidasa degrada péptidos aminoacídicos con un residuo aspartico N-terminal preferentemente.

Cheung y Cushman en 1971 describen un enzima de la fracción soluble de hígado de perro activada por iones Mn^{++} y con preferencia sobre Asp- β -NA frente a Glu- β -NA. Kelly y colaboradores en 1983 la caracterizaron mas extensamente, con un peso molecular de 450.000 Kda, específica para aminoácidos ácidos en la fracción soluble de cerebro de ratón, sin capacidad de hidrolizar sustratos NA como Asp- β -NA o Glu- β -NA, y altamente inestable por lo que no se había podido caracterizar anteriormente.

Wilk y colaboradores en 1998 lograron purificarla estabilizando su actividad con tampón conteniendo 5-10% de glicerol. Desarrollaron un ensayo enzimático por el cual el producto de liberación de los sustratos Asp-Ala-Pro-NA o Asp-Ala-Pro-SM es luego degradado por exceso de dipeptidil peptidasa IV, produciendo cromógenos libres.

Las aminopeptidasas son determinadas rutinariamente usando naftilamidas (NA) como sustratos (aminoacil-arilamidas), las determinaciones de AspAP anteriores daban órdenes de actividad de pmoles por minuto y por gramo de proteína, tres veces menores a las medidas con Ala-Pro-NA. Ahora se ha visto que la Aspartato aminopeptidasa constituye más del 0,1% de las proteínas solubles de cerebro de conejo, así, debería de verse como una de las principales proteinasas intracelulares.

Distribución: Es purificada a partir de extractos citosólicos de múltiples tejidos. Se encuentra en altas concentraciones, más del 0,1% de la proteína soluble.

Sustrato Artificial: α -aspartil- β -naftilamida (α -Asp- β -NA).

Propiedades Moleculares: Miembro de la familia de zinc-metaloproteasas M18, de 440 Kda, compuesta por 8 subunidades idénticas.

Acción: Su elevada concentración en la fracción soluble y su amplia distribución en los tejidos sugiere un papel en el metabolismo de proteínas y péptidos intracelulares. Una función más específica sería el metabolismo de la angiotensina II, colecistoquinina 8 y neuropéptido K. Cataliza la hidrólisis del aminoácido N-terminal de péptidos, siempre que este sea un aminoácido dicarboxílico. Los restos aspartilos son hidrolizados más rápidamente que los restos glutamilos. No afecta a otros aminoácidos (Cheung y Cushman 1971).

GLUTAMATO AMINOPEPTIDASA

Número E.C: 3.4.11.7.

Nombre e historia: Este enzima fue identificado por primera vez en secciones de riñón de rata y de cobaya, como una α -glutamil peptidasa, que catalizaba la hidrólisis de la N(α -Lglutamil)- β -Naftilamida. Posteriormente se descubrió que el enzima hidroliza residuos aspartil N-terminal y exhibe primariamente actividad exopeptidasa. Por lo tanto fue llamada aminopeptidasa A (α -amino Acídico peptidasa) (Glenner y cols. 1962).

Debido que los derivados α -L glutamil son más eficientemente hidrolizados que los derivados α -L aspartil, el enzima es ahora denominado como glutamil aminopeptidasa. Preparaciones de diferentes fuentes, y el uso de distintos sustratos para determinar la actividad del enzima, han llevado a asignarle diferentes nombres. Estos incluyen aspartato aminopeptidasa, angiotensinasa A, glutamato aminopeptidasa activada por Ca^{+2} , aminopeptidasa de membrana II y antígeno BP-1/6C3.

Distribución: Encontrada en suero y diferentes órganos de animales, es el típico enzima microsomal solubilizable por detergentes La amplia distribución tisular del enzima ha sido puesta de manifiesto por técnicas inmunohistoquímicas y por ensayo histoenzimático (Li y cols. 1993). El enzima es particularmente abundante en los bordes en cepillo de los enterocitos intestinales y en riñón.

Sustrato Artificial: α -glutamil- β -naftilamida (α -Glu- β -NA).

Propiedades Moleculares: Ectoenzima unido a membrana de la familia de metaloproteasas M1. Su peso molecular es de 107,8 KDaltons. Es un dímero simétrico donde cada subunidad contiene un átomo de Ca^{++} . Se inhibe por agentes quelantes como EDTA y EGTA así como por la amastatina (Healy y Wilk 1993).

Función fisiológica: Cataliza específicamente la hidrólisis de residuos no sustituidos de Glu- y Asp- β -naftilamidas y de péptidos. Es típico que los residuos glutamilos sean más fácilmente hidrolizados que los aspartilos. Tanto el grupo alfa-amino

como el gamma-carboxilo deben estar libres, lo que se demuestra por la falta de actividad sobre residuos piroglutamilos, gamma-glutamilos, o de glutamina.

Un sustrato fisiológico de este enzima bien conocido es la angiotensina II, un importante regulador de la presión sanguínea. Por eso, también ha sido denominada angiotensinasa (Nagatsu y cols. 1965; Sakura y cols. 1983). Su principal función es la formación de angiotensina III a partir de angiotensina II, la cual es mediadora de los efectos del sistema renina-angiotensina en cerebro, además del control de liberación de la vasopresina y colecistokinina 8 (Taylor 1996; Song y cols. 1993; Healy y Wilk 1993).

Recientemente se han producido ratones con deficiencia en este enzima, (Lin y cols. 1998) y el desarrollo de células T y B parece ser normal. Se requieren estudios más avanzados que clarifiquen el papel de este enzima en las rutas de diferenciación temprana de las células B, la presión homeostática sanguínea y otros procesos fisiológicos.

La progesterona ejerce estimulación dosis dependiente de la producción de AP A (Katsumata y cols. 2001).

PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA I

Número E.C.- 3.4.19.3.

Nombre e historia: El enzima que libera piroglutamato del extremo N-terminal de un peptido fue por primera vez descrito a partir de *Pseudomonas fluorescens* por Doolittle y Armentrout (1968), quienes descubrieron que el ácido piroglutámico (pGlu) podría ser liberado a partir de pGlu+Ala. El hígado de rata fue la primera fuente a partir de mamíferos donde el enzima fue descrito. El enzima ha sido llamado también 5-oxoprolil-peptidasa, piroglutamato aminopeptidasa, pirrolidocarboxilato peptidasa y pirrolidocarboxilil peptidasa. El nombre recomendado por la IUBMB es piroglutamil peptidasa I (Barret y cols. 1998).

Distribución: Ampliamente distribuido como un enzima citosólico en los tejidos. La pGluAP manifiesta generalmente una localización soluble o citosólica. Está ubicuamente distribuida, habiendo sido encontrada en una diversidad de tejidos animales y humanos, en particular en cerebro y sistema digestivo. En mamíferos ha sido purificada a partir de numerosos tejidos, incluyendo cerebro de cobaya hipófisis de oveja, cerebro de rata, y más recientemente cerebro de ganado vacuno (Cummins y O'Connor 1996; Barret y cols. 1998).

Sustrato Artificial: piroglutamil- β -naftilamida (pGlu- β -NA).

Propiedades Moleculares.- Enzima monomérico de peso molecular 24.000 Daltons, aunque en cerebro de rata se le ha reconocido como un enzima de 60.000 Daltons, pH óptimo 7,5. Es inestable cuando se almacena a 4°C pero puede estabilizarse con pirrolidona. Contiene dos residuos de cistina uno de los cuales esta implicado en su actividad catalítica (Yoshimoto 1993).

Función fisiológica: *In vitro*, la pGluAP I es capaz de liberar el residuo de pGlu N-terminal de un amplio número de péptidos biológicamente activos, incluyendo la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), neurotensina y bombesina (Browne y O'Cuinn 1983).

No han sido presentadas aún evidencias definitivas de la inactivación de neuropéptidos *in vivo* con pGluAP I.

La función del enzima permanece sin clarificar. Se ha propuesto, debido a la analogía con otras aminopeptidasas solubles, que la pGluAP I puede contribuir a la fase final del catabolismo intracelular de péptidos a aminoácidos libres, los cuales son entonces liberados al pool celular (Awadé y cols. 1994). Por eso, este enzima puede, al menos en parte, estar involucrado en la regulación de pGlu libre del espacio celular.

Es digno de mención que el pGlu libre posee propiedades farmacológicas (Awadé y cols. 1994). Así una ruta específica para la producción de pGlu, por ejemplo a través de la actividad pGluAP I, puede ser utilizada para producir este aminoácido.

Albert y Szewczuk (1972) también ha sugerido que la pGluAP I puede participar en la absorción de péptidos y proteínas en el tubo digestivo.

La primera aplicación práctica de la pGluAP I fue en la secuenciación de proteínas y péptidos. En la actualidad, aunque los métodos enzimáticos y químicos están disponibles para abrir el anillo de pGlu, y los métodos físicos como la espectrofotometría de masas ha superado parcialmente las dificultades debido al bloqueo del pGlu N-terminal, la pGluAP I es todavía utilizada en secuenciación para confirmar la presencia de este residuo (Awadé y cols. 1994).

PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA II

Número E.C.- 3.4.19.6.

Nombre e historia: La hormona liberadora de tirotrópina (TRH, tiroliberina, pGlu-His-Pro-NH₂), fue la primera hormona hipotalámica hipofisiotrófica cuya estructura se determinó. Estimula la secreción de varias hormonas de la hipófisis: la hormona estimulante del tiroides (TSH), prolactina y, bajo ciertas condiciones mayoritariamente patológicas, también a la hormona del crecimiento.

Además de estas funciones neuroendocrinas, la TRH tiene otros efectos biológicos en el Sistema Nervioso Central (S.N.C.), sugiriendo que podría también actuar como neuromodulador y/o neurotransmisor. Esta interpretación está apoyada por la observación de que la TRH y los receptores de la TRH están ampliamente distribuidos por el S.N.C.

Estudios sobre el catabolismo de la TRH (O'Cuinn y cols. 1990) revelan que la hidrólisis de la tripéptido amida en la unión pGlu-His es catalizada por 2 enzimas, uno citosólico y otro unido a membrana.

El enzima soluble posee características de la conocida piroglutamil peptidasa, también denominada piroglutamil peptidasa I (pGluAP I) para diferenciarla del enzima degradador de TRH unido a membrana, el cual ha sido designado como piroglutamil peptidasa II (McDonald y Barrett 1986) o piroglutamil aminopeptidasa II. En contraste con la actividad soluble no específica, este enzima no es una piroglutamato peptidasa corriente, sino un enzima que posee un extraordinariamente alto grado de especificidad por el sustrato, y por eso también ha sido denominado enzima degradador de la TRH unido a membrana o ectoenzima degradador de TRH. Debido a la estricta especificidad por el sustrato de la forma sérica, este enzima también ha sido llamado tiroliberinasa (Bauer y cols. 1981).

Distribución: Los mayores niveles de actividad pGluAP II se han encontrado en cerebro y en el S.N.C. La actividad específica varía considerablemente entre diferentes regiones cerebrales. Mientras se ha encontrado la mayor actividad en el bulbo olfatorio, corteza cerebral e hipocampo, considerablemente menor actividad es detectada en cerebelo, médula espinal e hipófisis posterior. También se han encontrado niveles de actividad significativos en retina, pulmón e hígado mientras el resto de tejidos están casi desprovistos de esta actividad peptidásica. (Barret y cols. 1998)

Sustrato Artificial: piroglutamil- β -naftilamida (pGlu- β -NA).

Propiedades Moleculares.- Metalopeptidasa glicosilada dependiente de zinc, de 230.000D, formada por 2 subunidades idénticas. Estudios con distintos tipos de células de cultivo han demostrado que la pGluAP II es un verdadero ectoenzima, localizado como una proteína integral de membrana en la superficie de neuronas y células hipofisarias, pero no gliales (Bauer y cols. 1990; Cruz y cols. 1991).

Función fisiológica: Los análogos de la TRH no son o son minimamente hidrolizados por el enzima, indicando que la molécula de TRH es reconocida en su totalidad. Con la excepción de pGlu=Phe-Pro-NH₂ sólo tripéptidos que comienzan con la secuencia pGlu-His son pobres sustratos para el enzima (Kelly y cols. 1997). Ningún otro péptido biologicamente activo con pGlu N-terminal como la neurotensina, gastrina y bombensina son hidrolizados por esta peptidasa. Curiosamente la LHRH con la secuencia pGlu-His inhibe la degradación de la TRH pero no es hidrolizada por la pGluAP II (Barret y cols. 1998; Elmore y cols. 1990).

El extraordinariamente alto grado de especificidad por el sustrato indica que la pGluAP II puede servir para funciones muy especializadas.

En el cerebro, la alta actividad enzimática y específica localización en células neuronales sugiere que el enzima podría ser importante para la transmisión de señal TRH. En la pituitaria anterior la actividad enzimática es fuertemente regulada por hormonas periféricas.

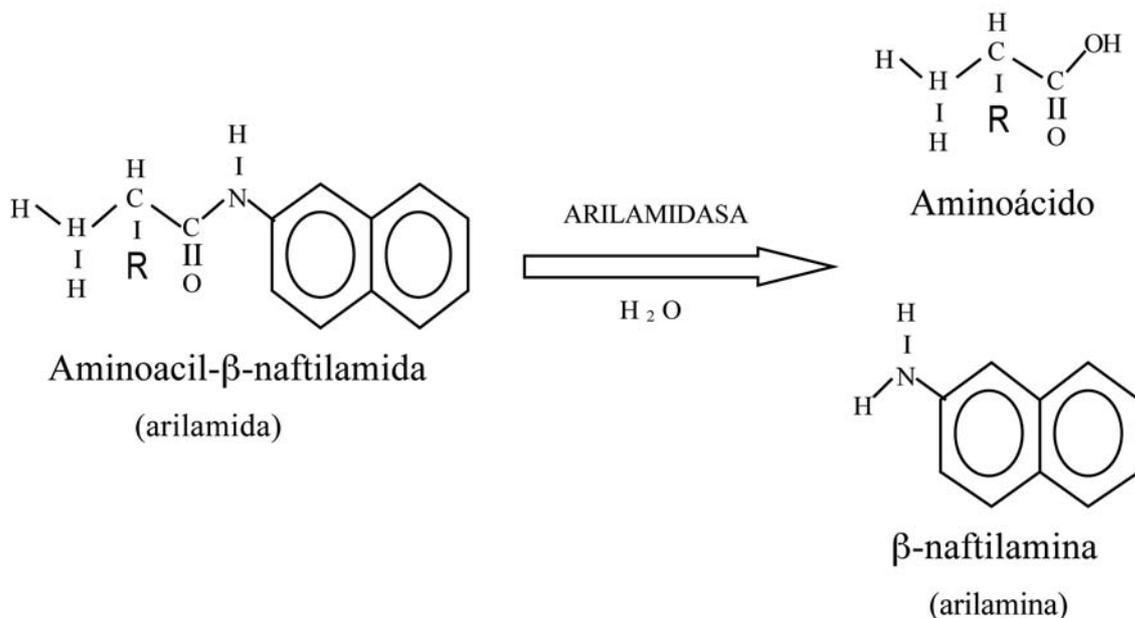
En ratas, la actividad y los niveles de ARNm del enzima se incrementa rápidamente después de la administración de triyodotironina y a la inversa, descienden cuando el animal es hipotiroideo (Schomburg y Bauer 1995). Efectos contrarios fueron observados con estradiol (Bauer y cols. 1990). La regulación tejido-específica del

enzima adenohipofisial confirma el concepto de que el enzima por si mismo podría servir en funciones reguladoras controlando la sensiblilidad de las células diana adenohipofisial y, de esta forma, regulando la secreción de hormonas de la pituitaria.

1.2. Determinación de la Actividad Aminopeptidasa

Para la determinación de estas actividades enzimáticas, los principales sustratos de elección son los péptidos naturales y los modelos sintéticos. Debido a que se conoce relativamente poco en relación a los principales sustratos endógenos de la mayoría de las proteinasas (endopeptidasas) y peptidasas (exopeptidasas), un buen método de trabajo es la utilización de diversos sustratos artificiales junto con el uso de inhibidores específicos.

Los sustratos artificiales, tales como aminoácidos o péptidos sintéticos de bajo peso molecular que contienen grupos cromogénicos, permiten una rápida cuantificación de la actividad. La hidrólisis del sustrato libera al cromógeno, una sal diazolica, naftilamina o p-nitroanilina. El cromógeno libre puede entonces ser cuantificado colorimétricamente o fluorimétricamente. Uno de los principales métodos de detección de la actividad de estos enzimas es llevado a cabo mediante el uso de sustratos artificiales del tipo de las Aa- β -naftilamidas (Aa- β -NA), también llamadas arilamidas, introducido por Gomori en 1954 para la determinación de la LeuAP. La reacción enzimática se representa en la siguiente figura:



Sin embargo, posteriormente se demostró que la clásica LeuAP y la actividad resultante de la utilización de Leu- β -NA como sustrato se correspondía con dos enzimas diferentes (Patterson y cols, 1963). Desde entonces, se suele utilizar el

término arilamidasa para nombrar a los enzimas detectados mediante el uso de las arilamidas como sustratos.

La especificidad de cualquier enzima está determinada por dos tipos de interacciones enzima-sustrato. La interacción primaria determina la especificidad primaria del enzima, que es controlada por los dos aminoácidos que forman el enlace sensible del péptido. La interacción secundaria determina la especificidad secundaria, que depende de la secuencia y número de aminoácidos adyacentes al enlace sensible.

La mayoría de las proteinasas y peptidasas rompen más de un tipo de enlace peptídico. La especificidad de un enzima es en parte determinada por la secuencia de aminoácidos que existe en la vecindad de la unión sensible del sustrato, y en la acomodación de esta secuencia al lugar activo del enzima. Se ha observado que la distribución subcelular de las actividades hidrolíticas varía dependiendo del sustrato que utilice: bien el péptido natural o la aa- β -NA (Hui y cols, 1981).

Así, utilizando encefalinas como sustrato, los máximos niveles de actividad se encontraron en la fracción soluble y los mínimos en la sinaptosomal. Sin embargo, utilizando Tyr- β -NA como sustrato, la mayor actividad se obtuvo en la fracción mitocondrial y la menor en la fracción soluble. Esto demuestra que la liberación del residuo de Tyr a partir de la encefalina y de la arilamida, está regulada por grupos de aminopeptidasas con diferente actividad y especificidad, siendo la cinética diferente según se usen encefalinas o derivados de arilamidas como sustratos` (Hui y cols, 1982).

Además, la liberación del residuo de Tyr a partir de la Met- y Leu-encefalina, no es paralela en las regiones cerebrales y en las fracciones subcelulares, demostrando que el aminoácido del extremo opuesto (Met o Leu) también influye de forma significativa en la actividad hidrolítica. Todo lo anterior indica que la conformación tridimensional condiciona la acción del enzima (Hui y Lajtha 1986).

2. Lípidos en la Dieta

2. LIPIDOS EN LA DIETA

(Tratado de nutrición, Hernández y Sastre, 1999; Grasas y aceites en la nutrición humana. Consulta FAO/OMS de expertos, 1993; Lipids in nutrition and Health: a reappraisal, Chael I. Gurr (The Oily Press), 1999)

Las grasas alimentarias incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales o animales que se ingieren como alimentos. Están constituidas por componentes químicos distintos que comparten su insolubilidad en agua y solubilidad en disolventes orgánicos. Desde el punto de vista alimentario, los componentes lipídicos cualitativa y cuantitativamente más importantes y característicos son los triglicéridos. Estos compuestos son ésteres del glicerol con ácidos grasos que tienen gran contenido energético, proporcionan como valor medio, unas 9 kcal/g frente a las 4 kcal/g que originan los hidratos de carbono y las proteínas.

Otros lípidos más complejos pero menos abundantes son los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos los cuales forman parte de las membranas biológicas y modulan su actividad. El colesterol forma parte también de membranas y es precursor de esteroides hormonales, ácidos biliares y vitamina D. Es también minoritario en la dieta en relación con los triglicéridos, aunque suele ingerirse en exceso.

La grasa puede estar en forma "visible" como es el caso de los aceites, mantecas o el tocino, pero en otras ocasiones la grasa esta "oculta", mezclada con los alimentos o formando parte de tejidos, lo cual constituye un problema para la valoración de la ingesta lipídica.

El alto contenido energético de los triglicéridos se ha asociado siempre con la obesidad. Más recientemente se está prestando una atención especial al colesterol y los diferentes tipos de ácidos grasos por su relación con las enfermedades cardiovasculares, inmunes, y el cáncer entre otras. Por lo tanto, se esta recomendando la disminución del contenido graso en la dieta, así como el equilibrio entre grasa saturada, monoinsaturada y poliinsaturada.

2.1. Acidos Grasos. Constitución Química y Nomenclatura

Los ácidos grasos son constituyentes tanto de los triglicéridos como de los lípidos complejos y pueden esterificar al colesterol. Los ácidos grasos más abundantes y

de interés biológico son ácidos carboxílicos de número par de átomos de carbono entre 4 y 26 fundamentalmente. Los ácidos grasos pueden ser saturados, es decir, con sus puntos de enlace ya ocupados, o insaturados los cuales tienen dobles enlaces (enlaces libres para unirse a otras moléculas), los monoinsaturados tienen un solo enlace doble y los poliinsaturados dos o más.

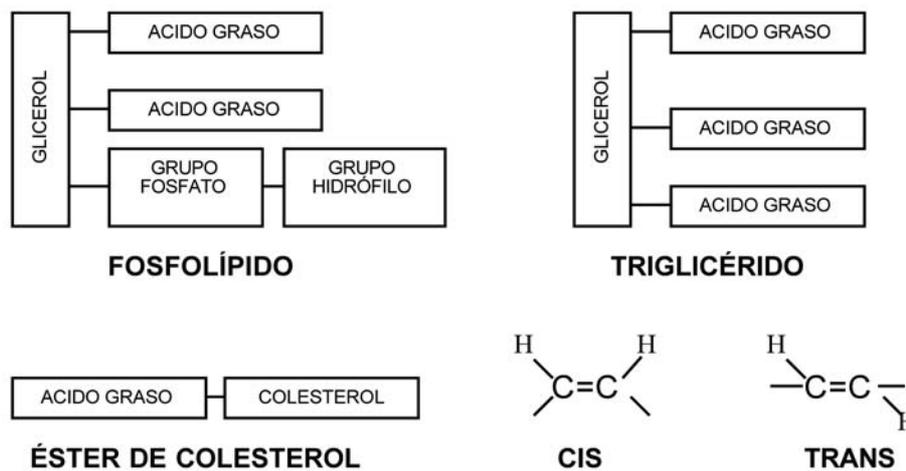


Figura 1. Tipos de lípidos presentes en los alimentos y distintas conformaciones (cis o trans) que pueden presentar sus dobles enlaces.

En los ácidos grasos naturales, la disposición espacial de los hidrógenos en los enlaces simples es trans mientras que los dobles enlaces adoptan casi siempre una conformación tipo cis la cual origina un acodamiento en la molécula. Los ácidos grasos con dobles enlaces tipo trans son rectos como los saturados, y en consecuencia presentan puntos de fusión más elevados que sus isómeros en cis y distintas propiedades biológicas. La conformación trans de los enlaces dobles suele aparecer por transformación química en procesos tecnológicos de hidrogenación, refinación de aceites, etc. (Figura 1).

Los ácidos grasos más frecuentes suelen tener un nombre común, además del nombre sistemático, así, el ácido graso saturado de 16 átomos de carbono, cuyo nombre sistemático es hexadecanoico, se suele conocer como ácido palmítico o, abreviadamente, 16:0 (16 átomos de carbono y ningún doble enlace). Cuando existen dobles enlaces la nomenclatura sistemática tradicional indica el carácter cis o trans y su posición contando a partir del grupo carboxílico. Así, el ácido linoleico se denomina 9cis,12cis octadecadienoico. Sin embargo, por razones fisiológicas, resulta más útil indicar sólo el número de carbonos, y de dobles enlaces indicando la posición del primero de ellos contando a partir del extremo metílico. Por ejemplo, el ácido linoleico sería el 18:2 n-6. Así, los ácidos grasos con la misma numeración omega estarían relacionados entre sí metabólicamente.

2.2. Ácidos Grasos en la Dieta

Los **ácidos grasos saturados (AGS)** están formados por cadenas de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces sencillos, lo que les permite cristalizar fácilmente y ser sólidos a temperatura ambiente. Nuestro organismo puede sintetizar AGS a partir del acetato, por lo que no son nutrientes esenciales. Todas las grasas animales, con excepción de las procedentes de los pescados, son saturadas. En el reino vegetal, sólo los aceites de palma, coco y palmiste son ricos en AGS.

Los AGS más abundantes en nuestra alimentación son el ácido láurico (12:0) que abunda en los aceites de coco y palma, el ácido mirístico (14:0) que se encuentra en la manteca además de en los aceites de coco y palma, y el palmítico (16:0) que es el más abundante en las grasas animales (leche, manteca y carnes), hallándose también en los aceites de coco y palma y en la manteca de cacao.

El principal **ácido graso monoinsaturado (AGM)** de la dieta es el ácido oleico (18:1,cis,n9) abundantemente distribuido en la naturaleza. La configuración cis confiere flexibilidad a la molécula facilitando el estado líquido a los aceites ricos en oleico. Los alimentos con mayor contenido en ácido oleico son el aceite de oliva, el de soja, y la carne de cerdo. En la actualidad existen en el mercado aceites procedentes de semillas como el girasol y el cártamo que se han enriquecido en ácido oleico por manipulación genética, en detrimento del ácido linoleico que es su componente natural mayoritario.

El ácido eláidico (18:1, trans, n9) es otro monoinsaturado que se produce por hidrogenación de aceites vegetales ricos en AGP y se encuentra fundamentalmente en las margarinas y grasas de obtención industrial.

En la dieta existen dos tipos de **ácidos grasos poliinsaturados (AGP)**, según posean la configuración n6 (w6) o la n3 (w3), dependiendo de la posición del primer doble enlace a partir del grupo carboxilo.

De la serie n6 el más importante es el ácido linoleico (18:2) constituyente principal de los aceites de semillas; maíz, girasol, cártamo, germen de trigo, pepita de uva y cacahuete. De la serie n3 el representante más característico es el ácido alfa-linolénico (18:3) presentes en los aceites de soja, colza y lino, donde se presentan en pequeñas cantidades pero suficientes desde el punto de vista nutricional. Los demás ácidos grasos de la serie n3 son de cadena larga y están presentes en animales acuáticos, los principales son el ácido eicosapentanoico (EPA o 20:5 n3) y docosahexanoico (DHA o 22:6 n3).

Los ácidos grasos linoleico (18:2 n6) y alfa-linolénico (18:3 n3) no pueden ser sintetizados por el organismo humano y únicamente se obtienen a través de la dieta. Sin embargo, se cree que una pequeña cantidad de ácido linoleico (alrededor de un 2% de la energía total) es suficiente para cubrir las necesidades en ácidos grasos esenciales. Sólo los vegetales pueden formarlos a partir del ácido oleico (18:1 n9) por introducción de nuevos enlaces dobles en la molécula hacia el extremo metílico y no hacia el extremo carboxílico que es como actúa la enzima desaturasa

en las células animales, formando así ácido octadecadienoico (18:2 n9). El ácido oleico a su vez también puede formarse por elongación y desaturación de los ácidos palmítico y esteárico.

En el caso de los animales acuáticos se produce una biosíntesis de AGP n3 de cadena larga a partir del ácido linoléico presente en el plancton (alimento para ellos). La necesidad de esta biosíntesis es un imperativo biológico para que la grasa del animal marino no se solidifique a la baja temperatura en la que viven. (Figura 2).

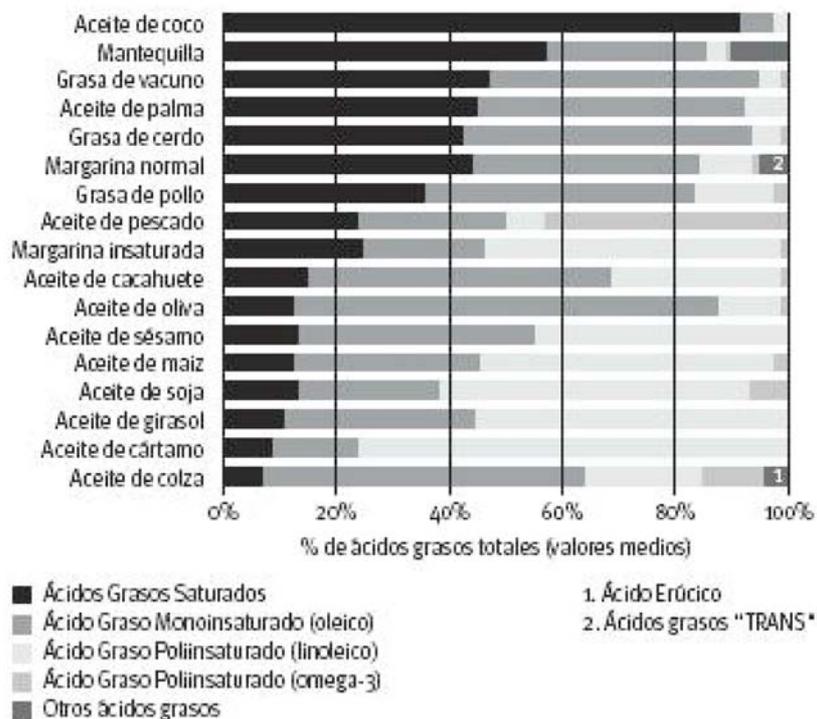


Figura 2: Composición en ácidos grasos de distintas grasas y aceites alimentarios.

2.3. Uso Nutritivo de los Lípidos. Digestión, Absorción y Transporte

La mayor parte de las grasas alimentarias se suministran en forma de triglicéridos, que se deben hidrolizar para dar ácidos grasos y monoglicéridos antes de ser absorbidos. En niños y adultos la digestión de las grasas se produce de forma eficaz y casi completa en el intestino delgado. En los recién nacidos, la secreción pancreática de lipasas es baja pero actúan la lipasa lingual y una lipasa presente en la leche materna.

El estómago interviene en el proceso de digestión de las grasas debido a su acción agitadora, que ayuda a crear emulsiones. Las grasas que entran en el intestino se mezclan con la bilis y posteriormente se emulsionan y son tratadas por las lipasas pancreáticas, las cuales catalizan la hidrólisis de los ácidos grasos de las posiciones 1 y 3, generando 2-monoglicéridos. Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa

A₂ dando lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la hidrolasa de ésteres de colesterol pancreática.

Los ácidos grasos libres y los monoglicéridos son absorbidos por los enterocitos de la pared intestinal. En general, los ácidos grasos con longitudes inferiores a 14 átomos de carbono entran directamente en el sistema porta y son transportadas hacia el hígado. Los ácidos grasos de 14 o más átomos de carbono se vuelven a esterificar dentro del enterocito y entran en la circulación a través de la ruta linfática en forma de quilomicrones. Sin embargo, la ruta de la vena porta también ha sido descrita como una ruta de absorción de los ácidos grasos de cadena larga. Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) y el colesterol son liberadas directamente en el hígado como una parte de los restos de quilomicrones.

Los ácidos grasos son transportados en sangre como complejos de albúmina o como lípidos esterificados en las **lipoproteínas** (Figura 3). Estas consisten en un núcleo de triglicéridos y ésteres de colesterol, y un revestimiento formado por una capa de fosfolípidos con moléculas esparcidas de colesterol sin esterificar. Las cadenas plegadas de las apolipoproteínas se extienden por encima de la superficie, y con los fosfolípidos anfipáticos, permiten que los lípidos del núcleo sean transportados por la sangre actuando como una especie de detergente, también regulan la reacción de la lipoproteína con enzimas específicos, y permiten la unión a receptores superficiales de las células.

Los **quilomicrones** son partículas lipoproteicas que proceden de las grasas alimentarias y son empaquetadas por las células de la mucosa. Entran en el torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos. La lipasa de lipoproteínas, en la pared interior de los capilares, hidroliza los triglicéridos, liberando ácidos grasos. Estos entran en el tejido adiposo, donde se almacenan, y en los músculos donde se utilizan como combustible. Los restos de los quilomicrones son depurados por el hígado durante las primeras horas que suceden a la ingestión de una comida con grasas.

Las **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)** son partículas de gran tamaño ricas en triglicéridos que se producen en el hígado a partir de la grasa endógena, a diferencia de los quilomicrones, que transportan grasa exógena. Las VLDL son las principales portadoras de triglicéridos y proporcionan ácidos grasos a los tejidos adiposo y muscular.

Las **lipoproteínas de baja densidad (LDL)** son los productos finales del metabolismo de las VLDL aunque también pueden formarse de novo en el hígado. Su núcleo está formado principalmente por ésteres de colesterol y su superficie sólo presenta un tipo de apolipoproteína; la apoB. Del 60-80% del colesterol plasmático es transportado por las LDL.

Las **lipoproteínas de alta densidad (HDL)** transportan el 15-40% del colesterol del plasma, realizando el transporte inverso, desde los tejidos al hígado. Probablemente se forman en el torrente circulatorio a partir de precursores generados en el hígado y en el intestino. Su principal apolipoproteína es la apoA-1.

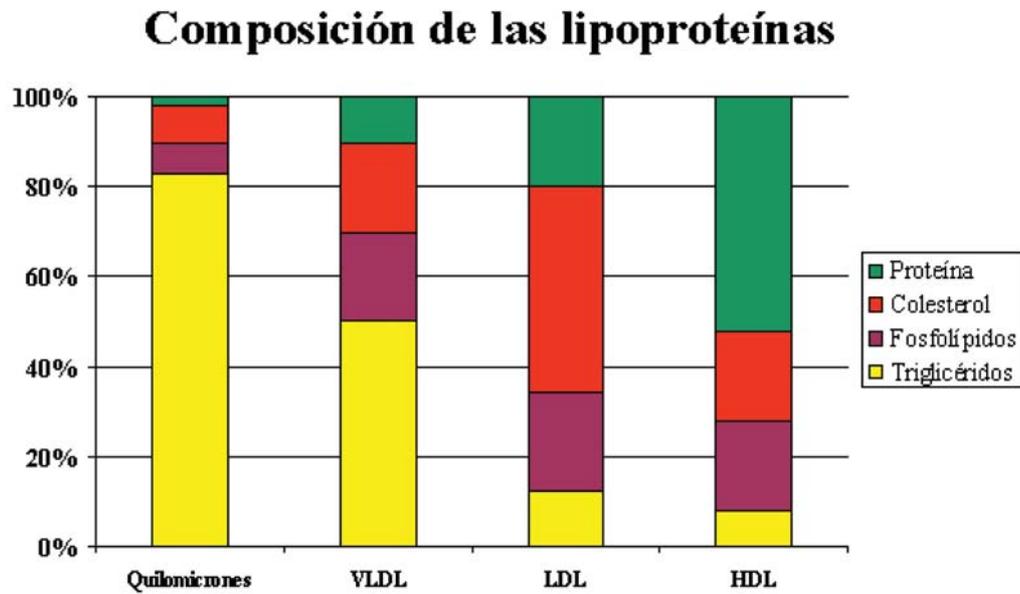


Figura 3. Composición de las distintas lipoproteínas.

2.4. Lípidos en la Dieta y Enfermedad Cardiovascular

Las investigaciones realizadas para precisar la influencia de la dieta sobre la prevalencia de las enfermedades cardiovasculares (EC) sugieren que puede existir una conexión entre ambas, aunque tal relación no esté aún bien definida. Una razón para ello es la dificultad que existe para estudiar aisladamente los efectos de los distintos componentes dietéticos; a ella contribuyen el gran número de variables que han de estudiarse y la magnitud y duración que es preciso dar a los cambios dietéticos para que puedan constatare variaciones claras de parámetros dependientes de la dieta y, sobre todo, de riesgo cardiovascular.

Entre los distintos factores dietéticos estudiados, las grasas son las que presentan una relación más firme y consistente con la enfermedad coronaria, y más que en la cantidad de grasa total, la importancia estriba en el tipo de ácidos grasos presentes en ella.

2.4.1. Influencia de las Grasas Alimentarias sobre el Metabolismo Lípidico

COLESTEROL

El hallazgo de que el colesterol de la dieta es altamente aterogénico en muchas especies animales ha reforzado la idea de que ingestas elevadas de colesterol pueden también ser aterógenas en humanos. Sin embargo, los humanos en general

responden menos al colesterol de la dieta que otras especies, y existe la evidencia de que el colesterol dietético tiene una menor influencia que la grasa saturada sobre la colesterolemia. Por lo tanto, aun siendo importante la reducción de su ingesta, lo es menos que la restricción en el consumo de grasa saturada.

El colesterol contenido en la dieta occidental habitual es de alrededor de 400 mg/día. La capacidad de absorción del colesterol en el intestino humano está limitada al 40-50% de lo ingerido, con amplias diferencias intra e interindividuales (Keys y cols. 1959; Katan y Beynen 1987; Katan y cols. 1988). Esta variabilidad depende de numerosos factores, entre ellos la rapidez del tránsito intestinal y la presencia en la luz intestinal de otros componentes de la dieta. Así, los triglicéridos (en los alimentos grasos) favorecen la absorción de colesterol, mientras que los esteroides vegetales (en alimentos ricos en fibra vegetal) y marinos (en el marisco) la reducen por competir con su absorción. Por otra parte, la capacidad de la mucosa intestinal de absorber colesterol parece estar determinada genéticamente (por ejemplo, la presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E determina una mayor absorción de colesterol que la del alelo E2) (Davignon y cols. 1988).

La mayor influencia del colesterol dietético sobre la colesterolemia se produce con ingestas diarias inferiores a 500 mg, pues esta cifra se aproxima al dintel medio a partir del cual la absorción disminuiría porcentualmente.

TRIGLICÉRIDOS

EFECTOS DE LA GRASA SATURADA SOBRE LAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS.

El efecto de los ácidos grasos saturados aumentando los niveles de colesterol total plasmático está bien establecido. Hace casi 30 años, los estudios dietéticos pioneros de Keys y Hegsted demostraron que al compararlos con los hidratos de carbono, los ácidos grasos saturados aumentaban la colesterolemia, los monoinsaturados tenían un efecto neutro y los poliinsaturados lo reducían. Sin embargo, la sustitución de saturados por monoinsaturados producía un descenso en las concentraciones de colesterol total. Si bien se reconoció el efecto hipocolesterolemizante de los monoinsaturados, se consideró inferior al de los poliinsaturados (Keys y cols. 1957; Hegsted y cols. 1965).

En años posteriores, diversos estudios han analizado el efecto de la dieta sobre el colesterol total (CT) y sus fracciones lipoproteicas. Está claramente demostrado que los ácidos grasos saturados aumentan el CT y el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL), mientras que los poliinsaturados los disminuyen (Mensink y Katan 1992; Hegsted y cols. 1993). Un mecanismo por el que aumentan el cLDL es a través de la supresión de la actividad de los receptores celulares para las LDL. Estudios en humanos indican que el efecto de los ácidos grasos saturados de elevar el cLDL se debe principalmente a una disminución de la eliminación de las LDL

circulantes (Woollet y cols. 1992). Otro mecanismo que se ha sugerido para el efecto hipercolesterolemizante de la grasa saturada es mediante la modificación de la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos tanto de las membranas celulares como de las lipoproteínas, interfiriendo con el funcionamiento normal de receptores celulares o reduciendo la interacción de las partículas lipoproteicas con los mismos (Grundý y Denke 1990).

La dieta contiene ácidos grasos saturados de distinta longitud de cadena. Como ya se ha mencionado, el efecto hipercolesterolemizante de los diferentes ácidos grasos saturados no es igual. Parece que tanto el ácido esteárico (18:0; el cual pasa fácilmente a ácido oleico en el organismo) como los de cadena corta (10:0 y menores) apenas modifican la colesterolemia (Bonanone y Grundý 1988; Zock y cols. 1994; Denke y Grundý 1992). Así, los ácidos grasos saturados más hipercolesterolemizantes (o aterogénicos) son el láurico (12:0), mirístico (14:0) y palmítico (16:0), por lo tanto las grasas potencialmente más aterogénicas son los aceites de coco y de palma, seguidos por la grasa láctea y la mantequilla obtenida de ella.

Estudios más recientes han comparado distintos AGS entre sí; unos trabajos confirman que el ácido mirístico es más potente en su efecto de elevar el LDL que el láurico o el palmítico (Kris-Ethernon y Yu 1997), pero en otros estudios no se encuentran diferencias significativas (Temme y cols. 1996).

Aunque el ácido esteárico tiene poco o nulo efecto sobre el nivel de LDL, podría disminuir el nivel de HDL comparándolo con AGM o AGP (Yu y cols. 1995), así el cociente LDL/HDL y apoB/apoA1 no se ve afectado, mientras que sí aumenta la concentración de lipoproteína plasmática (Lp_a), activa el factor VII (Mitropoulus y cols. 1994) y disminuye la fibrinólisis (Ferguson y cols 1970).

ÁCIDOS GRASOS, MONOINSATURADOS FRENTE A POLIINSATURADOS

Durante muchos años el interés sobre los ácidos grasos de la dieta se ha centrado en los saturados y los poliinsaturados. Esto motivó que la composición grasa de las dietas se expresase como el índice **P/S**, utilizándose este cociente como un determinante clave en la regulación de los niveles de colesterol.

Los ácidos grasos monoinsaturados fueron olvidados en la mayoría de estudios, por lo que la dieta habitualmente recomendada para reducir la colesterolemia y prevenir el desarrollo de EC sustituía los saturados por poliinsaturados, sin dar normas sobre los monoinsaturados.

A pesar del entusiasmo por aumentar los poliinsaturados de la dieta, no hay datos epidemiológicos sobre el beneficio a largo plazo de su consumo. Por el contrario, los datos epidemiológicos apoyan la ingesta de monoinsaturados. El "Estudio de los Siete Países" (Keys 1980) mostró que un consumo elevado de monoinsaturados derivados del aceite de oliva se asociaba tanto a bajos niveles de colesterol como a tasas reducidas de EC, datos que confirmaron otros estudios (Grundý y cols. 1982;

Jacobs y cols. 1992). En este estudio no se encontró ninguna población que de forma habitual consumiera cantidades elevadas de poliinsaturados.

Además, varios estudios en los últimos años han mostrado que tanto los poliinsaturados como los monoinsaturados tienen un efecto hipocolesterolemizante similar cuando ambos reemplazan en la dieta a los ácidos grasos saturados (Grundy y cols. 1982; Sacks 1994; Hu y cols. 1997).

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado una relación inversa entre las concentraciones de cHDL y el riesgo de EC (Ulbricht y Southgate 1991; NIH Consensus Conference 1993). En consecuencia, la dieta ideal para reducir la colesterolemia debería aumentar o, al menos, no disminuir los niveles de cHDL. En este sentido, estudios recientes han demostrado que la sustitución de ácidos grasos saturados por monoinsaturados no reduce el cHDL como se ha observado al sustituirlos por ácidos grasos poliinsaturados o por carbohidratos, sino que lo eleva mejorando así el cociente aterogénico (Mensink y Katan 1992; Hegsted y cols. 1993; Grundy 1989; Mata y cols. 1992).

En algunos estudios con dietas ricas en monoinsaturados en los que se observó un aumento de cHDL, éste se asoció a un incremento paralelo de las concentraciones plasmáticas de apo A-I, una apolipoproteína a la que se le atribuye un papel antiaterogénico importante. Existen evidencias de estudios clínicos y experimentales que sugieren que los poliinsaturados disminuyen las síntesis de apo A-I, mientras que un estudio en ratas alimentadas con dietas ricas en monoinsaturados ha mostrado un aumento de la expresión hepática del RNA mensajero de la apo A-I (Calleja y cols. 2000).

Es posible que los ácidos grasos insaturados disminuyan el cLDL como resultado de un incremento en la actividad de los receptores LDL, lo cual no sería un efecto intrínseco de estas grasas, sino un efecto pasivo, secundario a la sustitución de los ácidos grasos saturados. Es decir, las grasas insaturadas permitirían la expresión natural de la actividad de los receptores LDL, mientras que los ácidos grasos saturados reducirían dicha actividad activamente (Lindsey y cols. 1990; Woollett y cols. 1992; Hegsted y Nicolosi 1990; Fernández y cols. 1996).

En resumen, los ácidos grasos monoinsaturados son tan eficaces en reducir los niveles de cLDL como los poliinsaturados. Además, los monoinsaturados pueden aumentar las concentraciones de cHDL y de apo A-I. Estos efectos combinados de las dietas ricas en monoinsaturados inducen un perfil lipoproteico más favorable para disminuir el riesgo aterogénico.

Otros efectos beneficiosos que se han atribuido a los AGM son una mayor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes y una mayor resistencia a modificaciones oxidativas (Garg y cols. 1992; Parthasarathy y cols. 1990).

ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS N-3

Los estudios en poblaciones que consumen grandes cantidades de grasa n-3 en forma de pescado y otros animales marinos sugieren que estos hábitos dietéticos se asocian a una baja incidencia de EC. El mecanismo de este presunto efecto protector puede ser múltiple: modificación del perfil lipídico, inhibición de la agregación plaquetaria (fundamentalmente al disminuir la formación de tromboxano A₂), y reducción de la presión arterial y de la viscosidad sanguínea.

Los efectos de los ácidos grasos n-3 sobre el metabolismo lipoproteico son controvertidos y no están tan bien definidos como los de otros ácidos grasos insaturados. Aunque está bien demostrado que disminuyen la trigliceridemia, su efecto sobre los niveles de cLDL y cHDL depende del tipo de paciente y del estado de normo o hiperlipidemia. Así, en pacientes con hiperlipidemia los ácidos grasos n-3 disminuyen el cLDL si simultáneamente se disminuye el contenido dietético de ácidos grasos saturados. El efecto sobre el cHDL puede variar, desde no producir cambios o una ligera disminución hasta leves aumentos. Esto último se observa en pacientes con hipertrigliceridemia y probablemente se debe a la relación inversa entre los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y HDL.

Por tanto, el efecto más llamativo de los ácidos grasos n-3 sobre la composición lipoproteica es el descenso en los niveles plasmáticos de triglicéridos y VLDL, tanto en sujetos normo como hiperlipidémicos. Esta reducción se debe a la inhibición de la síntesis hepática de triglicéridos y VLDL (Harris 1989; Cunnane 1992).

Cuando se analizan los estudios que relacionan un consumo elevado de ácidos grasos n-3 con una baja mortalidad cardiovascular, como entre los esquimales de Groenlandia, deben hacerse algunas matizaciones (Kromann y Green 1980; Okuyama y cols. 1996); comparada con la dieta de la población de Dinamarca, los esquimales consumen casi cinco veces más ácidos grasos n-3, pero también casi el doble de ácidos grasos monoinsaturados. Además, su consumo en ácidos grasos saturados es claramente inferior al de los daneses. Estas diferencias en la composición de los diversos ácidos grasos de la dieta debería tenerse en cuenta cuando se relaciona el descenso del riesgo de EC con el consumo de ácidos grasos n-3 derivados del pescado, ya que dicha asociación podría estar sobrevalorada (Leaf y Weber 1988; Garcia-Closas y cols. 1993).

En todo caso, los *concentrados de aceites de pescado* han demostrado su utilidad para reducir la trigliceridemia en estudios clínicos a corto plazo y con dosis relativamente altas, habitualmente superiores a 5 g/día (Harris y cols. 1997). Estas dosis pueden tener también un discreto efecto antihipertensivo (Yosefy y cols. 1999). En pacientes con hipercolesterolemia los suplementos de ácidos grasos n-3 pueden incrementar el cLDL, y también se ha observado un empeoramiento del control glucémico de los diabéticos. No hay que olvidar, sin embargo, que cualquier suplemento con ácidos grasos n-3 incrementa el contenido corporal de poliinsaturados y, por tanto, la posibilidad de peroxidación lipídica, con sus potenciales efectos

tóxicos en las células. Otro efecto adverso sería la prolongación del tiempo de hemorragia (Sanders y Roshanai 1983; de Lorgeril y cols. 1994).

Si bien el uso clínico de los concentrados de poliinsaturados tipo n-3 dista mucho de estar establecido, no hay duda de que el consumo habitual de *pescado* en la dieta es beneficioso para la salud cardiovascular (aunque sólo sea porque al comer pescado no se come carne).

Varios estudios epidemiológicos retrospectivos han demostrado una correlación inversa entre la ingesta de pescado y el desarrollo de EC (Kromhout y cols. 1985; Albert y cols. 1998), mientras que en un reciente estudio prospectivo en pacientes que habían sobrevivido a un infarto de miocardio, aquellos a los que se había aconsejado comer pescado graso experimentaron una reducción del 29% de la mortalidad por cualquier causa a los 2 años en comparación con los no instruidos en este sentido (Burr y cols. 1989). Aunque no sabemos la cantidad de grasa de pescado que debe tomarse diariamente, parece que pequeñas cantidades (4-5 platos de pescado a la semana) durante largos períodos de tiempo pueden tener el mismo valor biológico sobre los efectos vasculares que el observado en estudios clínicos a corto plazo con dosis tan elevadas de n-3 como 4 g/día o más.

Otros nutrientes de origen marino y consumo frecuente en España son los moluscos y crustáceos, denominados genéricamente *marisco*. Este es habitualmente pobre en grasa total y relativamente rico en ácidos grasos n-3, con un contenido variable en colesterol (bajo en los mejillones, almejas y ostras; intermedio en el cangrejo, y relativamente alto en las gambas y calamares). Por otra parte, los moluscos de concha contienen cantidades apreciables de esteroides marinos, que compiten con la absorción de colesterol y pueden disminuirla. Por lo tanto, la utilización de marisco en sustitución de otras fuentes de proteínas en la dieta habitual puede tener un efecto beneficioso sobre la composición lipoproteica (Childs y cols. 1990).

ÁCIDOS GRASOS TRANS

En las recomendaciones dietéticas destinadas a la población y a los individuos dislipidémicos para modificar favorablemente sus niveles lipídicos se hace hincapié en la sustitución de grasa animal (saturada) por grasa vegetal (insaturada). La mayoría de grasas y aceites naturales contienen sólo dobles enlaces *cis* (orientados especialmente en el mismo lado de la molécula); sin embargo, la producción comercial de grasas vegetales sólidas (sobre todo, margarinas) implica la hidrogenación de éstas, un proceso que origina la formación de ácidos grasos *trans* (con los dobles enlaces orientados espacialmente en distintos lados de la molécula) a partir de los *cis*, además de la saturación variable de ácidos grasos insaturados.

Estos productos pueden contener hasta un 30% de ácidos grasos *trans* (sobre todo ácido eláidico, el isómero *trans* del ácido oleico), cuyos efectos sobre los lípidos y lipoproteínas parecen ser similares a los de la grasa saturada, elevan el nivel de colesterol LDL, triglicéridos y de lipoproteína a, y disminuyen el colesterol HDL.

Componentes	CHO-T y CHO-LDL	Triglicéridos	CHO-HDL
Grasa Total	↑	↑	↑
Colesterol	↑	=	↑
AGS	↑	↑	↑
AGM	↓	↓	= o ↑
AGP	↓	↓	= o ↓
AGTrans	↑	↑	↓
Exceso de calorías	↑	↑	↓

Tabla 1. Efecto de los componentes dietéticos sobre las lipoproteínas plasmáticas.

2.4.2. Influencia de los Lípidos Alimentarios sobre la Oxidación Lipídica

La respiración oxidativa es esencial para la vida celular, pero sí no es controlada adecuadamente tiene efectos potencialmente letales. Durante la respiración celular se producen radicales libres de oxígeno, que pueden lesionar las proteínas intracelulares y alterar las membranas y lipoproteínas a través de la peroxidación lipídica. Los sistemas biológicos se protegen contra la lesión oxidativa producida por los radicales de oxígeno mediante antioxidantes naturales, que pueden ser intra o extracelulares.

El nivel de insaturación de la grasa dietética conduce a la formación de membranas más o menos insaturadas, y por tanto, con mayor facilidad de alterarse oxidativamente; además, la LDL puede ser oxidada endógenamente y existen numerosas evidencias de que la LDL oxidada representa un importante papel tanto en el inicio como en el desarrollo de la arteriosclerosis (Mataix 1993).

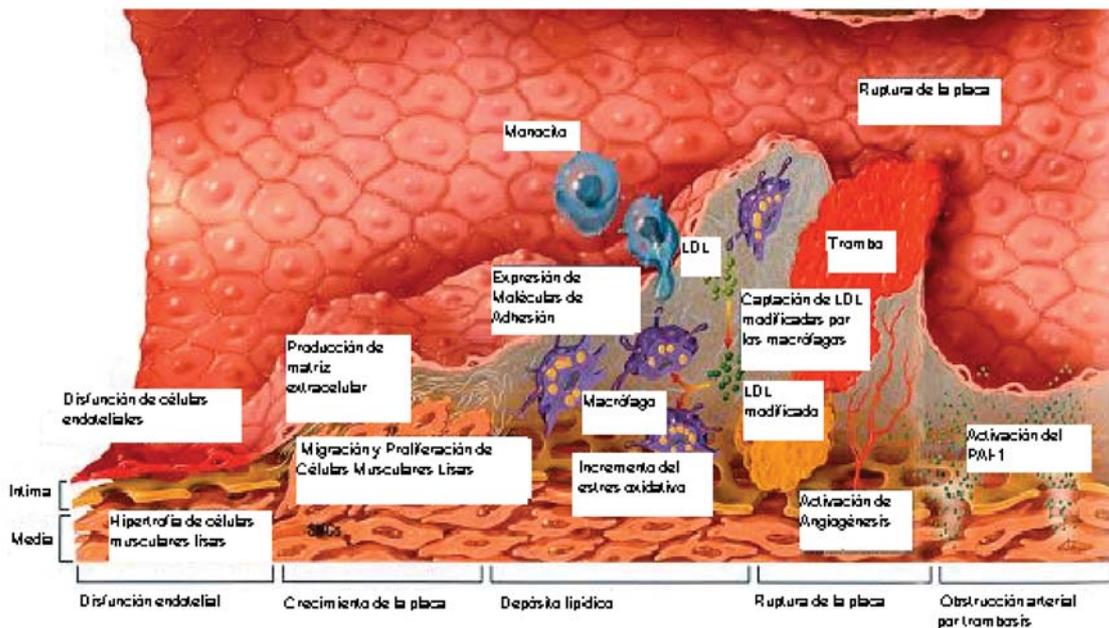


Figura 4. Progresión de la placa aterosclerótica.

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los aminoácidos de la apo B de las LDL determina que estas partículas lipoproteicas no sean catabolizadas por la vía normal del receptor de alta afinidad de las LDL, sino que sean captadas ávidamente por los receptores *scavenger* de los macrófagos, que se convierten en células espumosas, dando lugar a la estría grasa en la pared arterial. Por otra parte, las LDL oxidadas son quimiotácticas para los monocitos e inhiben la movilidad de los macrófagos y la producción del factor relajante derivado del endotelio (óxido nítrico); también pueden estimular la proliferación de las células musculares lisas y la agregación plaquetaria. Es evidente que todos estos efectos pueden considerarse como proaterogénicos, y existen evidencias crecientes de que los procesos oxidativos tienen un papel fundamental en el inicio y progresión de las lesiones ateromatosas en el hombre (Witztum y Steinberg 1991).

Determinados nutrientes, como las vitaminas E y C y los betacarotenos, se comportan como antioxidantes, y hay datos epidemiológicos que muestran una correlación inversa entre los niveles de vitaminas E y C y la mortalidad por EC (Gey y cols. 1991; Ulbricht y Southgate 1991).

Otros componentes de la dieta susceptibles de afectar a la oxidación lipídica son los ácidos grasos. Así, en estudios en humanos, las dietas ricas en poliinsaturados como el ácido linoleico o los ácidos grasos n-3 inducen unas LDL más susceptibles a la modificación oxidativa que las ricas en ácido oleico (Bonanome y cols. 1992). Estudios experimentales tanto en animales como en humanos han demostrado igualmente que las LDL enriquecidas en ácido oleico tienen una mayor resistencia a la oxidación (Mata y cols. 1996). También los componentes fenólicos del aceite de oliva virgen pueden contribuir a la capacidad antioxidante endógena de las LDL

(Mata y Alonso 2001). Parece, por tanto, que la grasa monoinsaturada puede tener efectos antiaterogénicos independientes de su influencia beneficiosa sobre el perfil lipídico.

2.4.3. Influencia de los Lípidos Alimentarios sobre la Trombogénesis

La aterogénesis es un proceso lento, progresivo y generalmente asintomático. Sin embargo, la trombosis sobreañadida es un proceso agudo, sintomático, y que puede tener consecuencias catastróficas sobre el curso de las enfermedades cardiovasculares. El balance entre la producción plaquetaria de tromboxano A₂, con un efecto vasoconstrictor y proagregante de las plaquetas, y la síntesis por el endotelio de prostaciclina 12, con su efecto vasodilatador y antiagregante, son factores determinantes en la génesis y desarrollo del proceso trombótico. Ambos eicosanoides derivan del ácido araquidónico (20:4), que a su vez procede del ácido linoleico (18:2).

Se ha sugerido que las dietas ricas en ácidos grasos saturados de cadena larga incrementan la agregación plaquetaria y aceleran la trombosis, mientras que los ácidos grasos insaturados, especialmente de la serie n-3, evitarían estos fenómenos. Los ácidos grasos n-3 pueden tener una acción antiateromatosa a través de los cambios inducidos en el metabolismo eicosanoide, ya que su aporte dietético disminuye la formación de tromboxano A₂, permaneciendo estable la producción de prostaciclina 12 (Adam y cols. 1986; Cunnane 1995).

Mientras que la actividad sobre la trombogénesis de la grasa poliinsaturada ha sido ampliamente estudiada, existen pocos datos sobre los efectos de la grasa monoinsaturada. Estudios recientes han demostrado que los ácidos grasos monoinsaturados derivados del aceite de oliva reducen la agregación plaquetaria al inhibir la síntesis de tromboxano A₂ y PG12 cuando se compara con una dieta rica en poliinsaturados n-6 (Lahoz y cols. 1997). Otro factor trombogénico como el factor VII aumenta con el consumo de AGS, sin embargo, una dieta rica en ácido oleico disminuye su activación (Bladbjerg y cols. 1995).

IMPORTANCIA DEL BALANCE ENTRE n-3 Y n-6

Debido a la competencia entre el ácido alfa linolénico (ALA) y el ácido linoleico por los mecanismos de elongación y desaturación de sus cadenas, la incorporación de ALA al plasma y los tejidos y su conversión a ácidos grasos n-3 de cadena larga están influenciados por los niveles de ácido linoleico. Por ello, el balance óptimo entre ambos AG de la dieta podría ser importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Chan y cols. 1993; McLennan y Dallimore 1995). Se ha sugerido reducción de incidencia de sufrir estas enfermedades con un cociente ALA/linoleico mayor que 0,10 (Hu y cols. 1999).

Cuando se ingieren ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, se producen más eicosanoides derivados del EPA, esto constituye un elemento preventivo de la trombogénesis, porque permite la formación de prostaciclina, PGI₃, de carácter vasodilatador y antiagregante plaquetario y de tromboxano TXA₃, sin apenas efecto vasoconstrictor y proagregante. Asimismo, EPA y DHA inhiben la formación a través de la inhibición de la conversión de linoleico a araquidónico y la actividad del enzima ciclooxigenasa, de prostaciclina, PGI₂, con efectos semejantes a la PGI₃, pero también de tromboxano, TXA₂ que sí tiene capacidad vasoconstrictora y agregante plaquetario. Por ello, es de esperar que el aumento del cociente ALA/linoleico disminuiría el riesgo de enfermedad cardiaca al disminuir el riesgo trombótico (Nair y cols. 1997).

Este mismo efecto antitrombogénico que presenta el EPA, lo muestra aunque más atenuado el ácido oleico produciendo un aumento de PGI₃ y TXA₃, al mismo tiempo que disminuye la síntesis de PGI₂ y TXA₂ (Sirtori 1998).

Además existen trabajos que muestran que cuando el aceite de oliva es la fuente del componente graso de la dieta, se produce una composición de membrana celular, en donde aumentan los ácidos grasos n-3, comparativamente a cuando la fuente grasa son aceites de semillas (girasol o maíz) Este hecho que sucede de forma generalizada en todos los tejidos, se observa también en todas las especies animales estudiadas (rata, cobaya, conejo, cerdo), así como en humanos (prematuros, diabéticos, enfermos cardiovasculares) (Girón y cols. 1989; Escudero y cols. 1998).

2.4.4. Influencia de los Lípidos Alimentarios sobre la Presión Arterial

Los estudios comparativos de poblaciones de distintos países, así como los efectuados en emigrantes y vegetarianos, sugieren que la dieta puede tener un papel determinante en la prevalencia de hipertensión arterial. Se ha relacionado con cifras altas de presión arterial la ingesta elevada de sodio y el consumo reducido de calcio, potasio, magnesio, fibra vegetal y vitaminas A y C.

El efecto sobre la presión arterial de la grasa de la dieta es menos conocido, pues hay pocos estudios y con resultados a veces contradictorios. (Beilin, 1987; Sacks, 1989; Iacono y Dougherty, 1993).

Colesterol y grasa total En varios estudios epidemiológicos extensos (Kay y cols., 1980; Salonen y cols., 1983; Khaw y Barret-Conner, 1984; Gruchow y cols., 1985; Elliott y cols., 1987; Joffres y cols., 1987) no se encontró ninguna asociación entre presión sanguínea y grasas alimentarias o colesterol. Sólo un estudio epidemiológico realizado con inmigrantes japoneses en Hawaii mostró que la presión sanguínea disminuía al aumentar la cantidad total de grasas de la alimentación y el colesterol (Reed y cols., 1985). El estudio transversal de la OMS denominado CARDIAC, que se llevó a cabo a escala mundial, demostró una relación directa significativa entre

los niveles séricos de colesterol y la presión diastólica sanguínea (Yamori y cols., 1993). Aunque existen limitaciones metodológicas para determinar los efectos de las grasas alimentarias en la hipertensión, los datos actuales indican que el aumento crónico del colesterol plasmático está relacionado con el aumento de la presión sanguínea diastólica, probablemente como resultado de las alteraciones vasculares ateroscleróticas.

Grasas saturadas y ácidos grasos monoinsaturados. Dos encuestas dietéticas realizadas en Finlandia mostraron una relación directa significativa entre los consumos de grasas saturadas y la presión sanguínea (Salonen y cols., 1983; Salonen y cols., 1988), pero en muchos otros estudios no se encontró dicha relación (Gruchow y cols., 1985; Elliott y cols., 1987; Joffres y cols., 1987; Williams y cols., 1987; Rubba y cols., 1987). En algunas poblaciones estudiadas, el nivel de ácidos grasos saturados del tejido adiposo tendía a relacionarse directamente con la presión sanguínea (Riemersma y cols., 1986; Hudgins y cols., 1991).

La información es escasa con respecto a los ácidos grasos monoinsaturados. En un estudio observacional se encontró una reducción de las cifras tensionales en relación con el consumo de estas grasas. Hasta ahora se han realizado 4 estudios de intervención con grasa monoinsaturada, Comparándola con dietas ricas en grasa saturada, ricas en grasa poliinsaturada y pobres en grasa. Los resultados en estudios de diseño tan variado son de difícil comparación, pero se ha observado que la presión arterial se reduce con la grasa monoinsaturada en comparación con la saturada, sin que exista una notable diferencia con respecto a las dietas pobres en grasa o ricas en grasa poliinsaturada. (Mensink y cols., 1988; McDonald y cols., 1989).

Ácidos grasos poliinsaturados. La regulación de la presión sanguínea se ve alterada en los animales que presentan deficiencia de ácido linoleico. Cuando se hizo que dichos animales se volvieran hipertensos haciéndoles beber una solución salina durante 9 días, la adición de ácido linoleico a la dieta normalizó la presión sanguínea a pesar de que se les continuara administrando solución salina (Cox y cols., 1982). Cuando no hay carencia, el ácido linoleico ejerce poco efecto en la presión sanguínea de los animales (Smith-Barbaro y cols., 1980; McGregor y cols., 1981; Mogenson y Box, 1982; Tobian y cols., 1982; Singer y cols., 1990; Shimamura y Wilson, 1991).

Los resultados de los estudios transversales realizados en seres humanos proporcionan pocas pruebas de los efectos del consumo de los ácidos grasos n-6 en la presión sanguínea. Las encuestas del National Health and Nutrition Examination (NHANES) de adultos en los Estados Unidos de América indicaron que el factor nutritivo que más sólida y constantemente estaba relacionado con la presión sanguínea era el índice de masa corporal (Harlan y cols., 1984); el nivel de calcio en el suero se relacionaba directamente y el de fósforo indirectamente con la presión sanguínea sistólica. El estudio no pudo mostrar ninguna relación entre presión sanguínea diastólica y grasas alimentarias. En general, no se observa una correlación significativa entre los consumos de ácidos grasos y de grasa total, determinados

según la historia dietética, y la presión sanguínea (Sacks, 1989). Además, existen pocas pruebas convincentes de que la cantidad o tipo de grasas tengan algún efecto sobre las personas con presión sanguínea normal o ligeramente elevada. Los estudios transversales de población son frecuentemente confusos a causa de la complejidad de la alimentación y de otras diferencias de estilos de vida.

El cociente entre grasas poliinsaturadas y saturadas es generalmente mayor en los vegetarianos que en las personas que no lo son. Se ha visto que el consumo de alimentos de origen animal se relaciona estrechamente tanto con la presión sistólica como con la diastólica (Sacks y cols., 1974). Los vegetarianos tienen presiones sanguíneas más bajas que los no vegetarianos, y presentan un gradiente de aumento de la presión sanguínea a medida que aumenta su consumo de huevos (Armstrong y cols., 1977). Con una dieta ovo-lacto-vegetariana, las personas de tensión normal muestran una disminución de la presión sanguínea (Rouse y cols., 1983). En relación con esto, se ha demostrado una caída de la presión sanguínea sistólica en personas ligeramente hipertensas que no recibían ningún tratamiento y que habían cambiado a una alimentación vegetariana (Margetts y cols., 1986). Sin embargo, al sustituir las grasas saturadas por carbohidratos o aceites ricos en ácido linoleico, no se producía ningún cambio favorable en la presión sanguínea (Sacks y cols., 1987). Los hábitos alimenticios vegetarianos influyen en muchos factores, y en consecuencia la interpretación de los estudios sobre este tipo de población se ve limitada. Incluso si existiera, sería difícil encontrar una relación entre las grasas alimentarias y la presión sanguínea, debido a la baja sensibilidad de los métodos dietéticos empleados, como el recordatorio de 24 horas y el registro de frecuencia de alimentación de 3-4 días. Sin embargo, el análisis bioquímico del cociente entre ácidos poliinsaturados y saturados en el tejido adiposo también mostró que no existía relación con la presión sanguínea (Berry y Hirsch, 1986; Riemersma y cols., 1986; Ciocca y cols., 1987; Rubba y cols., 1987).

Siete estudios han mostrado un descenso significativo de la presión sanguínea sistólica, hasta 13 mm Hg, y de la presión sanguínea diastólica, 7 mm Hg, en personas moderadamente hipertensas alimentadas con una alimentación enriquecida con n-6 (Iacono y Dougherty, 1993). Se identificaron otros siete estudios en los que no se producía ningún cambio significativo en la presión sanguínea de personas alimentadas con alimentos enriquecidos de modo similar. Las diferencias en la selección de las personas o en su observación de la dieta podrían explicar tal vez estas observaciones. Cinco estudios de intervención basados en comunidades de Finlandia, Italia y los Estados Unidos de América mostraron disminuciones de la presión sanguínea junto con un aumento del cociente entre grasas poliinsaturadas n-6 y grasas saturadas consumidas. Dos extensos estudios de cohorte realizados durante un período de cuatro años, en los que se exploraba a profesionales sanitarios de los Estados Unidos de América, uno referido a mujeres (Wittelman y cols., 1989) y el otro a varones (Ascherio y cols., 1992) no mostraron ninguna relación entre los ácidos grasos poliinsaturados de la alimentación y el desarrollo de la hipertensión. En dos extensos ensayos de intervención controlados llevados a cabo por el National Diet Heart Study Research Group (1968) y por el Research Committee to the Medical

Research Council (1968), no se observó ninguna influencia significativa de las grasas alimentarias en la presión sanguínea de las personas de tensión normal.

Ácidos grasos n-3. El efecto de los ácidos grasos n-3, principalmente de los ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA), en la presión sanguínea se debe al balance entre los eicosanoides vasodilatadores y vasoconstrictores en la pared vascular y en el riñón (Yin y cols., 1992; Shimokawa y cols., 1987; Lorenz y cols., 1983; Beilin, 1992).

En un ensayo controlado, 50 ml de aceite de pescado (15 g de ácidos grasos n-3) disminuye la presión sanguínea sistólica y diastólica de personas moderadamente hipertensas, pero son ineficaces 10 ml de aceite de pescado (Knapp y Fitzgerald, 1989). En comparación con el ácido linoleico o con el ácido alfa-linolénico, la suplementación de la alimentación con EPA más DHA también disminuye la presión sanguínea (Kestin y cols., 1990).

Cuando se compara el consumo de pescado (100 g de caballa al día) con el de carne, no se aprecia ningún efecto sobre la presión sanguínea, y el tiempo de sangría se prolonga considerablemente (Houwelingen y cols., 1987). Una prueba en la que la suplementación se realizaba tanto con aceite que contenía EPA + DHA como con la misma cantidad de aceite de maíz indicó que la reducción de la presión sanguínea dependía del aumento de los ácidos grasos n-3 en los fosfolípidos plasmáticos (Bonaa y cols., 1990). En los ancianos, se da una reducción de la presión sanguínea con el aceite de pescado cuando se combina con un bajo consumo de sodio (Cobiac y cols., 1992). Debe destacarse que entre los japoneses que comen pescado salado hay una alta incidencia de hipertensión y de accidentes vasculares cerebrales hemorrágicos.

Otros estudios han comprobado como el consumo de ácidos grasos n-3 producen una reducción en la presión sistólica y diastólica, tanto en sujetos normo como hipertensos (Appel y cols. 1993). En un estudio randomizado realizado en varones con sobrepeso y con leve hiperlipidemia, el consumo de 4g/día de DHA purificado produjo un descenso de la tensión arterial ambulatoria (Mori y cols. 1999). Otro estudio realizado en sujetos con hipertensión arterial esencial, demostró que el consumo de EPA (2,7g/día) se asoció a un incremento en el contenido en EPA de la membrana eritrocitaria, a una disminución en el contenido de sodio intraeritrocitario, y a una disminución en la presión arterial sistólica (Miyajima y cols. 2001).

3. Hipertensión Arterial

3. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La presión arterial (PA) se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared vascular, midiéndose de forma habitual en milímetros de mercurio (mmHg). Es una de las variables hemodinámicas más importantes y de ella depende la adecuada perfusión de los tejidos.

La PA depende de los valores del gasto cardiaco y de las resistencias vasculares sistémicas ($PA = GC \times RVS$).

El GC representa la cantidad de sangre que es bombeada por el corazón, por lo tanto la volemia (volumen sistólico del ventrículo izquierdo), la frecuencia cardiaca y la contractilidad miocárdica están relacionados con el GC, de tal manera que en presencia de taquicardia o ejercicio físico se incrementaría el GC y por lo tanto la PA. Mientras que la RVS hace referencia al diámetro de los vasos sanguíneos, representando la oposición de las arterias al paso de la sangre, y están directamente relacionadas con el calibre de los vasos, la viscosidad de la sangre, la elasticidad de la pared arterial y los mecanismos vasodilatadores y vasoconstrictores.

Como el corazón tiene una actividad cíclica, con periodos de contracción (sístole) y periodos de relajación (diástole) la PA cambia de acuerdo con el ciclo. La PA sistólica (PAS), presión máxima, se alcanza durante el periodo de sístole o contracción ventricular, la PA diastólica (PAD) o mínima se obtiene durante la relajación ventricular.

Cuando la presión arterial sistémica está elevada de forma sostenida, por encima de unos valores considerados como normales, se habla de hipertensión arterial (HTA). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como un factor de riesgo cardiovascular y aquí reside su importancia.

En 1925 las compañías de seguros norteamericanas presentaron las primeras pruebas del riesgo para la salud que supone la elevación de la PA.

Estudios prospectivos, que han incluido más de 400.000 individuos, han indicado un incremento lineal en el riesgo de accidente cerebrovascular y de insuficiencia cardiaca congestiva conforme se incrementa la presión arterial.

La distribución de la PA en la población adquiere una forma unimodal gaussiana, por lo que es difícil separar lo normal de lo patológico. Se considera HTA cifras tensionales medidas en condiciones basales mantenidas en el tiempo de PAS iguales o superiores a 140 mm Hg y/o PAD iguales o mayores de 90 mmHg.

Categoría	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Óptima	<120	<80
Normal	<130	<85
Límite superior de la normalidad	130-139	85-89
Hipertensión		
Estadio 1	140-159	90-99
Estadio 2	160-179	100-109
Estadio 3	>180	>110

Tabla 2. Clasificación de la PA en adultos.

3.1. Regulación Fisiológica de la Presión Arterial

La necesidad de la regulación de la PA se debe a que en todo momento la PA debe alcanzar una magnitud que le permita asegurar la perfusión de todos los tejidos. Como en el organismo la perfusión de la circulación cerebral es la que presenta mayor dificultad, el nivel de presión viene determinando por ella.

La PA es una variable hemodinámica que dispone de varios sistemas de regulación, ya que las necesidades de los tejidos no son constantes y las demandas son variables, es decir, la presión debe adaptarse a situaciones diferentes.

Los principales sistemas de regulación de la PA son:

Sistema nervioso: Es el mecanismo de regulación rápida de la PA, tarda en actuar segundos. El problema es que esta regulación se adapta muy rápidamente y deja de ser efectivo. Esta aparente limitación le confiere la capacidad de reducir las variaciones diarias de la PA a cerca de la mitad o de un tercio de lo que ocurriría si no existiera este sistema.

Sistema hormonal: Desde el comienzo del cambio de la presión están actuando conjuntamente el sistema hormonal con el nervioso, pero la actividad hormonal cobra mayor importancia cuando la eficacia de la respuesta nerviosa disminuye. Es más lenta en comenzar a actuar, tarda minutos, pero no se adapta. Dos son los efectos a través de los cuales actúa este sistema. En primer lugar modificando la hemodinámica renal regulando el tono vascular (hormonas vasoactivas) y/o la actividad cardíaca (frecuencia, contractilidad...) y en segundo lugar actuando directamente sobre el riñón controlando el volumen extracelular y plasmático, determinantes en el gasto cardíaco. Dentro de este grupo podemos encontrar:

- Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
- Oxido Nítrico

Sistema renal: El sistema más efectivo es el riñón, debido a su capacidad para controlar, instante a instante, el volumen circulante fundamental para mantener un gasto cardiaco normal y la larga duración de sus efectos. Esta acción la lleva a cabo mediante el fenómeno de diuresis de presión. Por lo tanto podemos decir que el riñón posee un papel dominante en la regulación a largo plazo de la PA y en la génesis de la HTA (Kaplan, 1992).

3.2. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

El sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) tiene un papel fundamental como regulador de la presión arterial sistémica y del volumen intravascular. Se activa por descensos bruscos en la presión arterial o por bajas concentraciones plasmáticas de sodio, liberando angiotensina II. Esta produce contracción directa de los vasos sanguíneos, incrementa la actividad del sistema nervioso simpático y provoca retención de agua y sodio por acción renal directa y por estimulación de la liberación de aldosterona de la cápsula suprarrenal.

Clásicamente el SRAA se consideraba como un sistema hormonal circulante. La renina, procedente del riñón, se libera a la circulación sanguínea, dónde actúa sobre su sustrato, el angiotensinógeno, de procedencia hepática, dando origen al decapeptido angiotensina I. La acción posterior del enzima de conversión de angiotensina (ECA), de localización fundamentalmente endotelial, da lugar al péptido activo de este sistema, la angiotensina II, que ejerce acciones sobre múltiples órganos diana, entre los cuales se encuentran el riñón, el corazón, los vasos sanguíneos, la cápsula suprarrenal, el cerebro, la hipófisis, los órganos reproductores, etc. Tras su interacción con receptores específicos, la Ang II se degrada por diferentes angiotensinasas a Ang III y péptidos inactivos.

Recientemente se ha demostrado la existencia de sistemas renina- angiotensina (SRA) tisulares que mediante mecanismos autocrinos y paracrinos ejercen un efecto sobre la proliferación de células musculares y fibroblastos de miocardio y de la pared vascular y que podría desempeñar un papel predominante en la fisiopatología de algunos síndromes cardiovasculares (Dzau 1990; Dzau y Re 1994; Dzau 1998).

3.2.1. Componentes del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

RENINA: Enzima proteolítico (EC 3.4.23.15) que se sintetiza y almacena en las células mioepiteliales de la arteriola aferente del glomérulo (aparato yuxtaglomerular) de forma inactiva como prorenina y actúa sobre el angiotensinógeno, único sustrato conocido in vivo (Oliver y cols. 1966), liberando el decapeptido angiotensina I. Esta

hormona es una glucoproteína con un peso molecular de 37.326 Daltons en el humano. La molécula está formada por dos lóbulos o dominios entre los cuales, en una hendidura profunda, se localiza el sitio activo del enzima. Dos residuos de ácido aspártico, uno en la posición 32 y otro en posición 215, están yuxtapuestos a la entrada de la hendidura y son esenciales para la actividad. Por tanto, la renina es una aspartil proteasa (Burt y cols. 1985;1989).

Al igual que otras hormonas, la renina se sintetiza como una gran preprohormona, la preprorenina de 45 Kda. Tras la hidrólisis del péptido señal y la glicosilación en el retículo sarcoplasmático rugoso, la prorenina, ahora de 47 Kda, se transporta al aparato de Golgi donde se produce la renina activa por hidrólisis del pro-fragmento (Matsuba y cols. 1989). La prorenina tiene una actividad biológica relativamente escasa.

Parte de la prorenina es convertida a renina en los riñones, y otra parte es secretada como tal. Hay muy poca conversión a renina activa en la circulación. La prorenina puede convertirse en renina por acción de la calicreína y de la catepsina B, pero los detalles de los procesos que conducen a la formación de renina a partir de prorenina *in vivo*, todavía no se han establecido (Laragh 1992).

La renina tiene una vida media en la circulación de 80 minutos o menos. Su acción consiste en separar el decapeptido angiotensina I (AngI) del extremo N terminal del angiotensinógeno.

El organismo regula los niveles circulantes de Ang II a través de la regulación de la secreción de renina por el riñón. La secreción de renina es en su mayor parte regulada y aparentemente proporcional a la cantidad de renina almacenada (Hackenthal y Nobiling 1994). Aunque también se ha descrito una secreción constitutiva dependiente de la velocidad de síntesis (Nielssen y Paulssen 1988), existen serias dudas acerca de esta vía de secreción.

La liberación de renina es el primer paso en la activación de SRA y la actividad de este enzima es el factor limitante para la formación de angiotensina I. La síntesis y liberación de este enzima responde principalmente a tres tipos de estímulos:

- Disminución del flujo renal por cambios de la PA
- Disminución del contenido de sodio en el túbulo contorneado distal que es detectado por las células de la mácula densa renal.
- Estimulación β -adrenérgica mediada por terminaciones nerviosas del aparato yuxtglomerular renal.

Así mismo, la liberación de renina es inhibida por la vasopresina, el potasio de la dieta, por retroalimentación negativa originada en el propio sistema y mediado por los niveles plasmáticos de angiotensina II y por la retención de volumen y la elevación de la PA desencadenadas por la activación del eje (Hackenthal y Nobiling 1994).

ANGIOTENSINÓGENO O GLOBULINA X2: Es una glicoproteína, perteneciente a la fracción α -globulina de las proteínas plasmáticas circulantes, de síntesis

predominantemente hepática y ampliamente distribuida por toda la circulación. Contiene cerca de un 13% de carbohidratos, está formada por 453 residuos aminoacídicos y posee una secuencia señal de 32 aminoácidos que se le extrae en el retículo endoplasmático.

Se ha descrito una regulación negativa por Ang II (Schunkert y cols. 1992) y una regulación positiva por glucocorticoides (Deschepper y Dolmann 1992), estrógenos (Healy y cols. 1992), hormonas tiroideas (Hong-Brown y cols. 1992) y andrógenos (Chen y cols. 1992), así como por inflamación aguda a través de las interleuquinas (Itoh y cols. 1989).

ANGIOTENSINA I (ANGI): Es un decapeptido fisiológicamente inactivo que funciona como una prohormona de la angiotensina II. No obstante, algunas observaciones sugieren que la angiotensina I es capaz de estimular la liberación de catecolaminas de la médula adrenal e inducir sed cuando se inyecta en el sistema nervioso central (Fitzsimmons 1971).

ENZIMA CONVERTIDOR DE ANGIOTENSINA (ECA): (EC 3.4.15.1.) Se trata de una metalopeptidasa de Zinc no específica que actúa convirtiendo el decapeptido AngI en el octapeptido angiotensina II, desprendiendo el extremo His-Leu, que es biológicamente activo. Este enzima se sintetiza en el endotelio vascular de numerosos órganos encontrándose en mayor abundancia en el pulmón, actuando también en cerebro, glándulas suprarrenales y ovarios.

Se encuentra principalmente como glicoproteína de membrana, en dos formas distintas, la forma endotelial con un peso molecular de 150-180 KDa, y la forma testicular, de aproximadamente 90 KDa (Soubrier y cols. 1988). Por otra parte existe una forma de ECA soluble y circulante que probablemente proceda de la hidrólisis de la forma endotelial. A pesar de la existencia de distintas formas enzimáticas sólo existe un gen en el genoma humano, situado en el cromosoma 17q23, aunque con promotores específicos para cada enzima, por lo que están regulados de forma hormonal diferente; así, el ECA testicular se induce por andrógenos (Nadaud y cols. 1992), mientras que el ECA endotelial está regulado negativamente por Ang II y positivamente por inhibidores del ECA y dexametasona (Krulowitz y cols. 1984; Shai y cols. 1990).

El ECA es un enzima poco específico que hidroliza unidades dipeptídicas de múltiples sustratos además de la Ang I, como la sustancia P, las encefalinas, neurotensina, LHRH, colecistokinina 8 y péptido quimiotáctico, a las que inactiva provocando acciones biológicas paralelas.

RUTAS ALTERNATIVAS PARA LA FORMACIÓN DE ANGIOTENSINA II: Se han descrito varias vías alternativas para la síntesis de Ang II que permiten sintetizar este péptido directamente a partir del angiotensinógeno o de la Ang I sin la

participación del ECA ni de renina. Uno de estos enzimas fue denominado enzima generador de Ang II sensible a quimostatina (CAGE), y fue descrito en la capa adventicia de aorta y en el endotelio de arteria renal de perro. Este enzima parece ser idéntico al descrito por Urata y colaboradores en 1990 en corazón humano, denominado **quimasa cardíaca humana**. Este enzima es una proteinasa parecida a la quimiotripsina que cataliza la hidrólisis de Ang II a partir de Ang I mucho más eficazmente que el ECA. En el corazón humano la quimasa parece ser responsable del 80% de la producción de Ang II, mientras que el ECA produciría el 20% restante. La localización de estos dos enzimas es también diferente, mientras que el ECA se localiza fundamentalmente en las células endoteliales y se expresa más en las aurículas, la quimasa se expresa en la región intersticial cardíaca en mastocitos, células endoteliales y del mesénquima, y su expresión es mayor en ventrículo. La quimasa es un enzima ubicuo, tiene actividad en tracto gastrointestinal, útero, pulmón, hígado, vasos sanguíneos y piel (Urata y cols. 1994). Su función y regulación no son conocidas aún, aunque se piensa que ambos enzimas generadores de Ang II podrían tener papeles distintos pero complementarios. El desarrollo de inhibidores de esta quimasa podría establecer la relevancia fisiológica y patofisiológica de este enzima.

ANGIOTENSINA II (ANG II): Es un octapéptido, es el componente biológicamente más activo del sistema y ejerce sus funciones actuando directamente sobre receptores específicos y también indirectamente interactuando con otros sistemas.

La Ang II, que se denominó hipertensina o angiotensina, produce constricción arteriolar y una elevación de la presión arterial sistólica y diastólica. Es uno de los más potentes vasoconstrictores conocidos, de 4 a 8 veces más activo sobre una base ponderal que la noradrenalina, en personas normales. Sin embargo, su actividad presora está disminuida en personas con deplección de sodio y en pacientes con cirrosis y algunas otras enfermedades. En estas condiciones, la Ang II aumenta en la circulación, pero se regula su actividad al disminuir los receptores de la angiotensina en el músculo liso vascular. En consecuencia, se obtiene una menor respuesta a la Ang II que se inyecte.

La Ang II también actúa directamente sobre la corteza suprarrenal para incrementar la secreción de aldosterona, siendo el sistema renina-angiotensina uno de los reguladores principales de la secreción de aldosterona. Las acciones adicionales de la Ang II incluyen la facilitación de la liberación de noradrenalina por una acción directa sobre las neuronas simpáticas postganglionares, la contracción de las células mesangiales, con una disminución resultante en la filtración glomerular, y efectos adicionales directos sobre los riñones.

La Ang II actúa en el cerebro para aumentar la presión arterial, la ingestión de agua y la secreción de vasopresina y ACTH. No penetra la barrera hematoencefálica, pero desencadena estas respuestas al actuar sobre los órganos circunventriculares, cuatro pequeñas estructuras en el encéfalo que están fuera de la barrera hematoencefálica. Una de estas estructuras, el área postrema, es la encargada

principal del efecto presor, mientras que dos de las otras, el órgano subfornical (OSF) o subtrigonal y el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT), están encargados del aumento de la ingestión de agua (efecto dipsógeno). No se sabe con certeza cuáles de los órganos circunventriculares causan el aumento en la secreción de vasopresina y ACTH (Kaplan 2002).

ANGIOTENSINASAS: La Ang II es destruida rápidamente, siendo su vida media en el humano de uno a dos minutos. Los enzimas que destruyen la AngII se reúnen bajo el término de angiotensinasas. Incluyen una aminopeptidasa, la **AP A**, que separa el residuo de Asp de la terminal N del péptido. El heptapéptido resultante, a diferencia de los otros fragmentos peptídicos, tiene actividad fisiológica y se llama angiotensina III (Ahmad y Ward 1990). Además, dicha AP puede actuar sobre la AI para producir la des-Asp-AI, y este compuesto puede ser convertido directamente en Angiotensina III por la acción de un enzima conversor (Wright y Harding 1995). La actividad angiotensinasa se encuentra en los eritrocitos y muchos tejidos. Además, la Ang II parece ser eliminada de la circulación por una especie de mecanismo captador en los lechos vasculares de tejidos distintos al pulmonar. Otras angiotensinasas son la **AP M** o Alanina aminopeptidasa y la **AP B** o Arginina aminopeptidasa las cuales actúan sobre la Ang III hidrolizando su extremo N-terminal convirtiéndola en Angiotensina IV (Abhold y Harding 1988).

ANGIOTENSINA III (ANG III): La Ang III ([des-Asp] Ang II) tiene cerca del 40% de la actividad presora de la Ang II, pero mantiene el 100 % de la actividad estimulante de aldosterona. Por tanto, se ha sugerido que la Ang III es el péptido natural estimulante de aldosterona, en tanto que la Ang II regula la presión arterial. La Ang III por acción de la AP B o AP M (Ala y Arg AP) se convierte en Angiotensina IV.

ANGIOTENSINA IV (ANG IV): La AngIV también es activa y parece implicarse en procesos de memoria y flujo cerebral. Administrada centralmente posee un reducido efecto presor, pero actúa como vasodilatador en el riñón (Wright y Harding 1995).

ANGIOTENSINA [1-7]: Producto obtenido a partir de la AngI por acción de diversas angiotensinasas, induce la liberación de óxido nítrico y de prostaciclina lo que le confiere un efecto vasodilatador que la hace muy interesante. Esta angiotensina está elevada en el tratamiento crónico con inhibidores del ECA. También se ha visto que estimula centralmente la liberación de vasopresina con una potencia similar a la de Ang II (Ferrario y cols. 1991).

ALDOSTERONA: Es un esteroide elaborado en la corteza de la glándula suprarrenal. Los principales estímulos para su liberación son:

- Angiotensina II
- Hiperpotasemia
- ACTH

El efecto principal de la aldosterona consiste en facilitar la reabsorción de sodio y la eliminación de potasio en el túbulo contorneado distal de la nefrona. Estos fenómenos condicionan un aumento de la volemia conduciendo a la aparición de HTA dependiente de sal (Kaplan 2002).

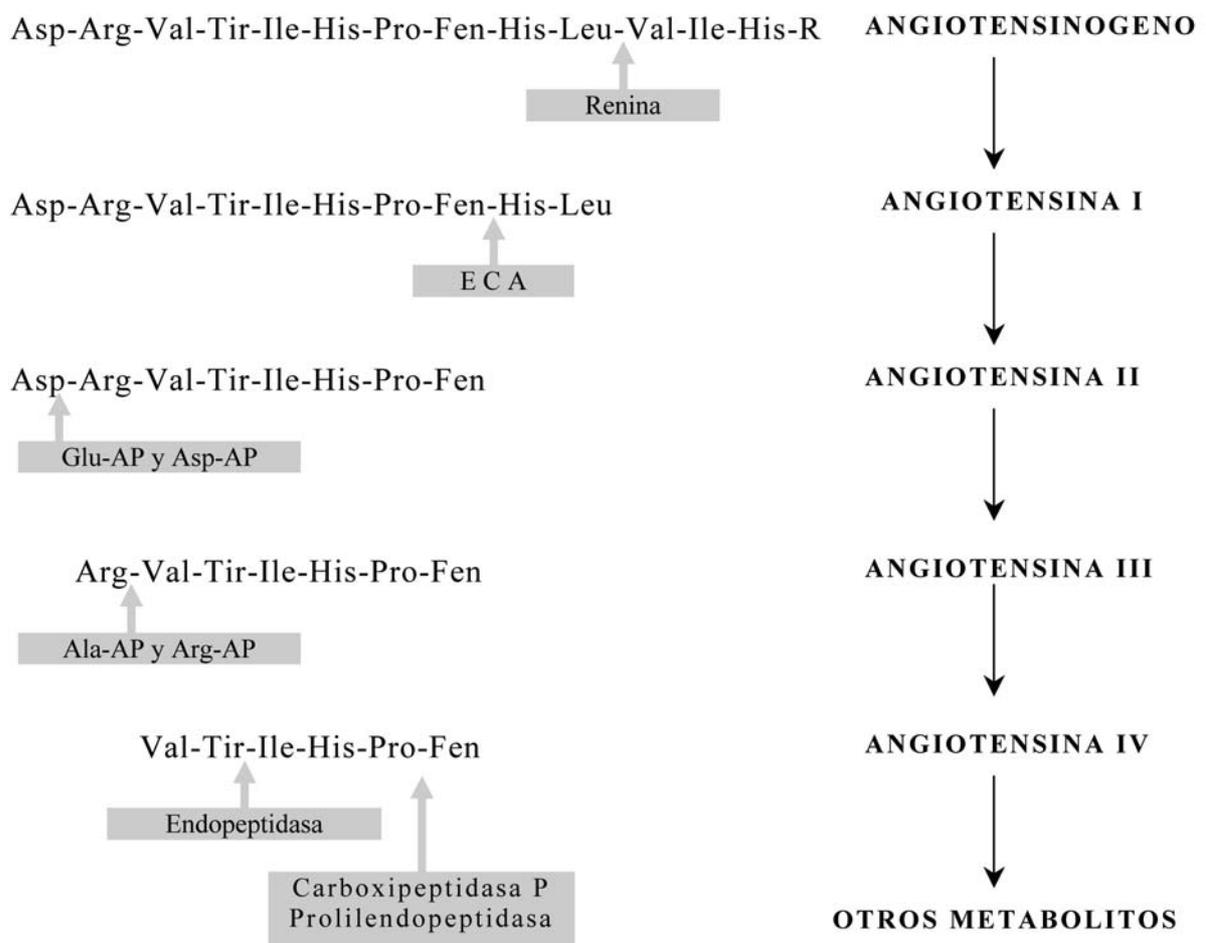


Figura 5. Estructura del extremo N-terminal del angiotensinógeno y de las angiotensinas I, II, III y IV, de origen humano. R, resto de proteína. Después de eliminar una secuencia líder de 24 aa, el angiotensinógeno de rata contiene 453 residuos de aa (Extraído de Ganong, 1994). (ECA: Enzima convertidor de Angiotensina).

RECEPTORES DE ANGIOTENSINAS

Múltiples investigaciones sugieren la existencia de subtipos de receptores con propiedades farmacológicas y bioquímicas diferentes. Así, se han identificado varios

subtipos de receptores de Ang II denominados AT_1 , AT_2 , AT_3 y AT_4 (Unger y cols. 1996).

El receptor **AT_1** pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G, que constan de siete dominios transmembrana α -helicoidales, de los cuales cuatro parecen ser extracelulares. Cada uno de estos dominios extracelulares presenta un residuo de cisteína y tres sitios potenciales de N-glicosilación (Murphy y cols. 1991; Sasaki y cols. 1991).

Este receptor se ha clonado y secuenciado revelando la existencia de dos subtipos AT_{1a} y AT_{1b} , el AT_{1a} se expresa fundamentalmente en riñón, corazón, pulmón, lechos vasculares, hígado, testículos y cerebro (Murphy y cols. 1992). El AT_{1b} se expresa únicamente en la cápsula suprarrenal y en la hipófisis, pero también puede encontrarse en cerebro, vasos sanguíneos y testículos aunque en menor cantidad. (Kakar y cols. 1992) Estos receptores están acoplados a una proteína G que activa a la fosfolipasa C, la cual produce hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2), que genera inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 estimula la liberación de calcio, mientras que el DAG activa la proteinkinasa C aumentando su afinidad por el calcio y por la fosfatidilserina.

Los receptores AT_1 responden mejor a Ang II que a Ang III y siendo así los mediadores de la mayor parte de los efectos conocidos de la Ang II y se bloquean específicamente por bifenilimidazoles, como el losartán (Chiu y cols. 1988).

Los receptores **AT_2** no pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, ya que carecen de sensibilidad a los análogos de GTP, no se acoplan a la adenilato ciclasa, ni a la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, pero presentan la estructura típica de los receptores acoplados a proteínas G (dominios transmembrana y sitios de glicosilación) (Mukoyama y cols. 1993).

El gen que lo codifica se localiza en el cromosoma X, tanto en humano como en ratón. El receptor AT_2 se expresa en altos niveles durante el desarrollo fetal, en adulto su expresión esta restringida, apareciendo sólo en adrenales, útero, ovario corazón y especialmente en cerebro (Nahmias y Strosberg 1995). La expresión de este receptor parece estar regulada por PKC y calcio, y se produce en células confluentes, no en células en estado de proliferación (Kijima y cols. 1996).

Tanto los mecanismos de transducción como las funciones del receptor AT_2 son objeto de una gran controversia. Se ha sugerido que podría modular la actividad de los canales calcio en las neuronas durante el desarrollo, lo que esta relacionado con procesos de crecimiento, diferenciación y adhesión celular (Nahmias y Strosberg 1995). También se ha sugerido que el receptor AT_2 este implicado en la regulación de la apoptosis (Yamada y cols. 1996), y en las funciones descritas para el receptor AT_1 como respuestas presoras centrales (Hogarty y cols. 1992), y presión de natriuresis (Lo y cols. 1995).

Se sabe que los receptores en las arteriolas y corteza suprarrenal se regulan de manera opuesta: un exceso de Ang II regula a la baja los receptores vasculares, mientras que regula hacia la alta a los receptores adrenocorticales, volviendo la

glándula más sensible al efecto estimulador de aldosterona por parte del péptido (Bottari y cols, 1993).

También se han descrito receptores **AT₃** y **AT₄**. Poco se conoce aún de ellos pero se sabe que los receptores AT₃ presentan baja afinidad por losartan y PD123177 pero alta afinidad por la saralasin y su activación se ve asociada con la formación de GMPc dependiente de óxido nítrico (Chaki e Inagami 1992). Los receptores AT₄ parecen estar implicados en el flujo sanguíneo cerebral y de la corteza renal, así como en el aumento del aprendizaje (Swansson y cols. 1992).

3.2.2. Mecanismos Fisopatológicos del SRA

SRA E HIPERTENSIÓN

- La Ang II es uno de los **vasoconstrictores** más potentes que se conocen, provocando aumento de las resistencias periféricas, con el consecuente aumento de la presión arterial. Este efecto se debe a dos mecanismos distintos:
 - Efecto local sobre la pared del vaso mediado por acción directa de la Ang II sobre receptores AT₁. La Ang II induce la liberación de endotelina (potente vasoconstrictor) y norepinefrina e inhibe su recaptación a nivel de las terminaciones sinápticas de la pared vascular.
 - Efectos potenciadores sistémicos, como la liberación de catecolaminas de la médula suprarrenal, (con el consiguiente aumento de la resistencia periférica y del gasto cardíaco), estimulación de la liberación de vasopresina, y del sistema nervioso simpático, además de facilitar la transmisión nerviosa en los ganglios estrellados.
- Otra función importante de la Ang II es el **mantenimiento de la volemia**, que se consigue a través de sus efectos a tres niveles:
 - Efecto renal directo, mediado por los receptores AT₁ que desencadenan una retención de sodio y agua a través de los efectos sobre el glomérulo (contracción de las células mesangiales, con una disminución de la filtración glomerular), el túbulo contorneado proximal y la médula renal.
 - A nivel de la glándula suprarrenal induce la liberación de aldosterona que actúa sobre el túbulo contorneado distal favoreciendo la retención de sodio y agua e induciendo la eliminación de potasio.
 - Efectos a nivel del S.N.C. facilitando la liberación de arginina-vasopresina (en la hipófisis) y estimulando el centro de la sed (Kaplan 2002).

SRA E HIPERTROFIA

También se ha relacionado a la Ang II con el desarrollo de hipertrofia cardíaca. En la hipertensión crónica las respuestas vasoconstrictoras incrementadas a diversos agentes vasoactivos, se han asociado a cambios estructurales de la pared vascular. El remodelado de las arterias es un proceso adaptativo para poder resistir el incremento de tensión intramural. Las paredes arteriales se vuelven más gruesas y duras debido a la hipertrofia del músculo liso de la pared vascular. Además el contenido en tejido conectivo aumenta. La Ang II estimula la formación de proteínas de matriz extracelular, como colágeno, fibronectina y trombospondina (Wolf y cols. 1991), e incrementa factores de crecimiento, como el derivado de plaquetas y el de crecimiento tumoral (Powell y cols. 1989).

SRA E HIPERPLASTIA

Tras tratamientos quirúrgicos de pacientes con aterosclerosis coronaria, es frecuente que sufran de una restenosis por proliferación de células del músculo liso vascular y formación de la capa de neoíntima por aumento de matriz extracelular, produciéndose de nuevo oclusión del vaso.

En este proceso se produce una inducción del ECA dándose una mayor formación de Ang II y una degradación incrementada de bradiquinina (potente vasodilatador y antiproliferativo). Además del aumento de Ang II, existe una inducción de la expresión de receptores AT₁ en la neoíntima (Viswanathan y cols. 1994).

Tanto el tratamiento con inhibidores del ECA, como el tratamiento con el antagonista del receptor AT₁ de Ang II; losartan, reducen la formación de la neoíntima de manera significativa (Powell y cols. 1989; Azuma y cols. 1992).

3.2.3. Sistemas Renina Angiotensina Tisulares.

Recientemente se ha demostrado la existencia de SRA tisulares cuyo papel en la fisiopatología de la HTA podría ser importante por dos motivos.

- Participación en la regulación sistémica de la presión arterial.
- Promover el crecimiento celular que podría ser un importante mediador del daño desarrollado a nivel de los órganos diana.

El papel de los SRA tisulares en la regulación de la PA es controvertido. Por otra parte, el papel de la Ang II como promotor del crecimiento de células de músculo liso especialmente a nivel renal, vascular y cardíaco está mejor definido (Thurmann, 1999). Así, los procesos patológicos de hipertensión, hipertrofia o hiperplasia asociados con los sistemas renina angiotensina locales, podrían tener un tratamiento

farmacológico con el cual inhibiéramos selectivamente el sistema local afectado, sin modificar los restantes.

Para poder hablar de un sistema local real, hacen falta que se cumplan unas condiciones: presencia de los componentes del SRA en el tejido, síntesis y/o modificación local de los componentes, regulación y funciones del sistema. La detección de ARNm es requisito imprescindible, pero no suficiente para demostrar síntesis local, por lo que es necesario también medir los niveles de proteína.

Aunque parece ser que la glándula adrenal, la hipófisis y los órganos reproductores son capaces de sintetizar y liberar prorenina al plasma, ésta nunca es convertida a renina (Sealy y Rubattu 1989). En los últimos años es aceptado que el riñón es el único órgano capaz de secretar renina activa a la circulación (Von Lutterotti y cols. 1994), de donde es captada por los diferentes tejidos en función de sus necesidades (Danser y cols. 1994).

Así, tanto el angiotensinógeno como la renina se incorporan a los tejidos desde la circulación y podrían regularse allí en función de las necesidades tisulares.

Se ha identificado un SRA tisular **renal** que regula la absorción de sodio y la hemodinámica intrarrenal así como el crecimiento de células mesangiales y del túbulo contorneado proximal. El efecto sobre el crecimiento de las células mesangiales parece mediado por el PDGF. También se ha detectado ARNm de renina en las células endoteliales de la pared vascular. Aunque todavía no se sabe si existe producción local de Ang II en la pared vascular, estudios experimentales han demostrado que la Ang II ejerce un efecto sobre la proliferación de las células musculares que parece estar mediado por PDGF y los oncogenes c-myc y c-fos.

De los múltiples papeles fisiológicos que desempeñan los SRA tisulares, quizás el más intrincado es el que se observa a nivel del **corazón**. Se han encontrado en el corazón humano normal y en el afectado por insuficiencia cardíaca, receptores funcionales de Ang II cardíaca. Parece que todos los componentes del SRA se encuentran también en el corazón, en la actualidad se acepta que el miocardio es capaz de sintetizar ECA, renina y angiotensinógeno además de disponer de vías alternativas para generar Ang II, que se cree que actuaría a través de receptores AT₁ para producir hipertrofia miocárdica y aumento de la contractilidad, aunque la interacción con el sistema nervioso simpático también podría ser importante. La Ang II podría estimular además la proliferación de los fibroblastos en el miocardio. Todo ello indica que el corazón no es sólo un órgano diana sino también un órgano endocrino o paracrino para la Ang II.

La información acumulada indica que muchos tejidos tienen sistemas que generan Ang II, en apariencia para uso local. Se han encontrado componentes del sistema renina-angiotensina **en útero, placenta y membranas fetales** donde actuaría en funciones de contractilidad y flujo sanguíneo. Hay una alta concentración de proteína en el líquido amniótico. Además, hay sistemas renina-angiotensina tisulares en la **glándula suprarrenal**, donde actuaría induciendo la secreción de aldosterona y catecolaminas, **testículos**, induciendo la síntesis de andrógenos y la contracción

de los túbulos seminíferos, **ovarios**, estimulando la ovulación y producción de estrógenos, **lóbulos anteriores e intermedios de la hipófisis, glándula pineal, cerebro y ojos**. Las glándulas submaxilares de los ratones machos tienen particularmente valores altos de renina.

La función de estos sistemas renina-angiotensina tisulares esta aún por confirmar, sin embargo, se sabe que la renina tisular contribuye muy poco al fondo común de renina circulante ya que la actividad de la renina plasmática desciende a casi cero cuando son extirpados los riñones (Phillips y cols, 1993).

3.3. Hipertensión Arterial y Aterosclerosis

La hipertensión arterial es el principal factor de riesgo para enfermedad cardiovascular, siendo la aterosclerosis la causa de la mayoría de sus complicaciones; isquemia coronaria, accidente cerebrovascular y arteriopatías de los miembros inferiores (Sihm y cols. 1995).

Los cambios estructurales en las arterias de los hipertensos parecen ser producidos por el remodelado de sus paredes, el diámetro de la luz vascular disminuye produciéndose un aumento de la resistencia vascular periférica e incrementando la presión arterial (PA), también se da disminución del flujo e isquemia tisular, a lo que se agrega disfunción endotelial y como consecuencia una respuesta contráctil anormal (Schiffrin 1998). Además, los vasos de resistencia de los hipertensos presentan un incremento en el espesor de la capa media, un mayor índice media/lumen y un área media mayor, comparados con arterias de personas normotensas (Aalkjaer y cols. 1989), lo cual corrobora el remodelado vascular en la hipertensión esencial (Sihm y cols. 1995). Tanto las alteraciones estructurales (remodelado, hipertrofia e hiperplasia) como las funcionales (rigidez y disminución de elasticidad) ocurre en los estadios tempranos de la hipertensión y aún antes que la elevación de los valores tensionales (Neutel y cols. 1999).

También se ha descrito una mayor prevalencia de placas ateroscleróticas en las arterias de los hipertensos (Garipey y cols. 1994; Zanchetti 2001). La presencia de aterosclerosis ha sido relacionada positivamente con la edad, la presión arterial, la diabetes, el tabaquismo, el aumento de fibrinógeno, la homocisteína y los triglicéridos plasmáticos.

RELACIÓN ENTRE EL SRAA Y LA ENFERMEDAD ATEROESCLERÓTICA

Hasta ahora los estudios clínicos y de laboratorio se han orientado casi exclusivamente a dilucidar el papel del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) en la hipertensión, por lo que su papel como inductor directo de aterosclerosis apenas se ha estudiado. Laragh y Aldermann fueron los primeros que llamaron la atención sobre la relación entre los niveles de renina plasmática y el riesgo de sufrir infarto agudo de miocardio (Laragh 1992; Aldermann y cols. 1991).

En la actualidad se le reconoce al elemento principal del SRAA, la angiotensina II (AngII) la capacidad de incrementar el estrés oxidativo en la pared endotelial, inducir proliferación celular, ser un agente proinflamatorio e interferir en la coagulación, propiedades éstas capaces de inducir enfermedad arterial coronaria (Dzau 1998). Asimismo, la presencia de enzima convertidor de angiotensina (ECA) y de la AngII han sido demostradas en el tejido vascular y estarían involucradas en el desarrollo de lesiones arteriales (Dietz y cols. 1996; Dzau y Re 1994).

Los mecanismos mediante los cuales la AngII y la aldosterona, efectores finales del SRAA, pueden afectar la estructura y función de las arterias no son del todo conocidos, aún así, son considerados probables responsables del daño vascular causado por la AngII, la mutación génica del ECA, disfunción endotelial, oxidación de las LDL, proliferación y migración de las células musculares lisas (CML) y la activación de procesos inflamatorios y de coagulación (Guzman, 2000).

SRAA Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El ECA ligado al endotelio, además de producir AngII degrada a la bradiquinina disminuyendo así su efecto vasodilatador. Ambos efectos alteran la función endotelial (Ferrario y cols. 1996). La regulación del tono vascular es una de las funciones prioritarias del endotelio y es ejercida mediante la producción y secreción de óxido nítrico (ON), el cual exhibe propiedades antiaterogénicas; vasodilatadoras, antiagregantes plaquetarias e inhibitorias del crecimiento y la migración celular (Hornig y Drexler 1997; Ribeiro y cols. 1992). La activación del SRAA en situaciones patológicas como en la hipertensión arterial ha sido ligada con un deterioro en la producción y actividad del ON y de sus propiedades protectoras del endotelio. Además, la AngII induce una producción aumentada de radicales libres deletéreos para la pared vascular (Griendling y cols. 1997).

El LDL oxidado es captado de forma rápida y descontrolada por los receptores "depuradores o barrenderos" de los macrófagos, formándose "células espumosas", componentes principales de la placa esclerótica. El cLDL de sujetos hipertensos es más proclive a la oxidación que el de normotensos (Keidar y cols. 1994), e inversamente el cLDL de monos alimentados con dietas ricas en colesterol y tratados con antagonistas de la AngII es menos susceptible a la oxidación que el de los ejemplares no tratados (Strawn y cols. 2000). Además de la capacidad de favorecer la oxidación de las LDL, la AngII ejerce una acción inmunomodulativa sobre la maduración, extravasación y propiedades quimiotácticas de los monocitos, que junto a su acción sobre el O₂, contribuyen al "estrés oxidativo" que predispone a la aparición de la lesión aterosclerótica.

EFECTOS PROLIFERATIVOS DEL SRAA

La AngII ha sido identificada como promotora de crecimiento y acumulación celular, al igual que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el derivado

de los fibroblastos, o la trombina. Todos ellos interactúan con el factor de crecimiento insulina-símil 1 (IGF-1) potenciando sus efectos mitogénicos (promoción del crecimiento y diferenciación celular, aumento de síntesis protéica, prevención de apoptosis y estimulación de la migración celular)(Paquet y cols. 1990; Delafontaine 1998).

Además la AngII ejerce acción proliferativa directa a través de sus receptores AT1, estimulando la producción de matriz intercelular, la remodelación vascular y la hipertrofia cardíaca (Daemen y cols. 1991; Osterrieder y cols. 1991) lo cual puede producir isquemia por aumento de la relación masa miocárdica/capilaridad.

COAGULACIÓN Y SRAA

La AngII es capaz de aumentar la expresión del inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1 (PAI-1), el mayor inhibidor fisiológico conocido de la fibrinólisis. La aldosterona estimula también de forma sinérgica con la AngII la síntesis de PAI-1 (Brown y cols. 1998).

Únicamente el metabolito hexapeptídico de la AngII, la angiotensina IV (AngIV), es capaz de interactuar con el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el PAI-1 (Van Leeuwen y cols. 1994; Kerins y cols. 1995). La acción de la AngIV es ejercida a través de sus receptores AT4, sobre los cuales no actúan las drogas bloqueantes de los receptores AT1 para la AngII, pero sí serían influidos por los inhibidores del ECA que disminuyen los niveles de AngII, y por lo tanto de AngIV (Brown y cols. 1999).

3.4. Aminopeptidasas e Hipertensión Arterial

Aunque el significado funcional de las AP no es aún del todo conocido, su actividad hidrolítica juega un papel importante en la inactivación y regulación hormonal de péptidos activos circulantes o a nivel tisular (McDonald y Barrett, 1986). Por lo tanto, las AP junto con otros enzimas proteolíticos, participan en el control de los diferentes sistemas de péptidos con funciones reguladoras de la presión arterial.

El papel de las AP se ha estudiado esencialmente en relación a su participación en el sistema renina-angiotensina, cuya función circulante reguladora de la presión arterial es ampliamente conocida. Este sistema, en muchos casos con todos sus componentes, ha sido descrito en numerosos tejidos en los cuales su función aún no es conocida. Las AP participarían en dichos sistemas locales como reguladoras de la actividad de las diferentes angiotensinas del sistema, o de otros péptidos reguladores de la presión arterial, siendo su estudio de particular importancia.

PAPEL DE LAS AMINOPEPTIDASAS EN EL SRA

Como indicábamos con anterioridad, el sistema renina-angiotensina básicamente esta integrado por un precursor, el angiotensinógeno, que es hidrolizado por la

endopeptidasa renina para formar el decapeptido Ang I. La Ang I es hidrolizada por la ECA para formar el octapéptido Ang II, que constituye la primera molécula activa de la cascada. La Ang II se convertirá en el heptapéptido Ang III por actividad de la AP A o similar, responsable de la hidrólisis del Asp N-terminal de la Ang II (Ahmad y Ward, 1990). Una vía alternativa para la producción de Ang III, que no implica la formación de Ang II es a través del nonapéptido des-Asp¹ Ang I (Wright y Harding, 1995). Este nonapéptido, producido también por la acción de la actividad AP A es entonces hidrolizado por el ECA para formar angiotensina III. Sim y colaboradores (1993, 1994) han descrito que homogenados de aorta e hipotálamo de rata degradan Ang I casi exclusivamente a través de ésta vía anteriormente indicada. La Ang III se convertirá posteriormente en el hexapéptido Ang IV, por la actividad de AP B o similar que separa la Arg N-terminal (Abhold y Harding, 1988). La Ang IV también es activa y parece implicarse en procesos de memoria y flujo cerebral (Wright y cols, 1995).

Las AP juegan un papel prominente en el metabolismo de las angiotensinas. Determinaciones de los niveles de angiotensinas en cerebro, riñón, adrenales, ovario, útero y ojo indican altas concentraciones de estos péptidos (De Silva y cols, 1988; Ramírez y cols, 1996; Prieto y cols. 2003). También se han detectado niveles de estos péptidos activos en plasma humano (Campbell y Kladis, 1990). Además, otros fragmentos de Ang II, por ejemplo la Ang II [1-7] también ha demostrado tener diferentes acciones biológicas (Benter y cols, 1993). El estudio y la caracterización de las peptidasas implicadas en la formación e inactivación de estas angiotensinas es de considerable importancia.

La ruptura de la Phe-carboxiterminal de la Ang II, se puede llevar a cabo por diversas peptidasas que incluyen la Carboxipeptidasa P, endopeptidasa y prolil-endopeptidasa. La separación del Asp N-terminal se puede llevar a cabo por acción de la AP A, Leu-AP, AP M (que es capaz también de romper la Arg actuando como una endopeptidasa), la tripsina y la AP B. Finalmente diversas endopeptidasas, como la Catepsina G y la quimotripsina pueden actuar en la unión Tyr-Ileu para metabolizar los fragmentos restantes (Wright y Harding 1995).

Las conversiones de Ang II a Ang III y de Ang III a Ang IV son de particular importancia dado que la AP A (o similar) parece ser la responsable primaria para la ruptura del ácido aspártico a partir de la molécula de Ang II.

La AP A parece ser un enzima unido a membrana. Este enzima se encuentra en la circulación pero su origen parece proceder de la autólisis de la propia AP A unida a membrana (Wilk y Haely, 1993). Este esquema es similar al del ECA que también es un enzima originalmente unido a membrana pero que por autólisis llega a ser soluble en plasma (Williams, 1988). La AP A esta ampliamente distribuida en el organismo con niveles especialmente altos en los túbulos proximales renales (Lojda y Gossrau, 1980; Ramírez y cols, 1993; Prieto y cols. 2003), y se asocia con la vasculatura del hígado, pulmón, corazón e hipófisis (Song y Ye 1994). La AP A cerebral también se asocia con la vasculatura, especialmente con los pericitos de los microvasos. Estos pericitos expresan una amplia variedad de peptidasas unidas

a membrana (Healy y Wilk, 1993). Además, las células de los microvasos cerebrales expresan también receptores de angiotensinas (Speth y Harik, 1985). El predominio de AP A en las células endoteliales cerebrales puede servir para transformar la Ang II circulante en Ang III, y ésta entonces a Ang IV vía AP B. La Ang IV administrada centralmente ha demostrado poseer un reducido efecto presor (Writhg y Harding 1995), pero actúa como vasodilatador en el riñón (Coleman y cols, 1992) y en cerebro (Wright y cols, 1995). La importancia funcional de estas peptidasas cerebrales podría ser la de transformar la señal de la Ang. Así, un elevado nivel plasmático de Ang II, que produce vasoconstricción periférica podría ser rápidamente convertido en Ang IV por los microvasos cerebrales para activar los receptores de Ang IV que median la vasodilatación, de esta forma el cerebro se aseguraría el suficiente aporte sanguíneo durante una hemorragia o una descarga simpática.

MODIFICACIONES DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

La vía metabólica y la vida media de cada forma activa de la Ang es de considerable importancia clínica. La Ang II se ha asociado con la hipertensión, hipertrofia vascular y cardiaca y el resultante fallo cardiaco congestivo (Dzau, 1990). La Ang II también se ha asociado a la disfunción ventricular izquierda que sigue al infarto de miocardio (Pfeffer 1993, 1995). Estos estudios unidos a la eficacia terapéutica de los inhibidores del ECA en la hipertensión y el fallo cardiaco destacan la importancia de las angiotensinas en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. La Ang II también se ha implicado en la enfermedad renal. Así el tratamiento con inhibidores del ECA ha disminuido las tasas de morbilidad, diálisis renal y necesidad de transplante en pacientes diabéticos insulín-dependientes (Lewis y cols, 1993).

Se han empleado diversas estrategias para interferir en la formación de AngII y/o en su señal de activación. Como hemos indicado anteriormente, la aproximación de más éxito ha sido el uso de los inhibidores del ECA (por ejemplo, captopril, enalapril, etc) para prevenir la formación de Ang II. Un segundo objetivo se ha dirigido hacia la inhibición de la síntesis de renina pero los resultados han sido desalentadores debido a la escasa biodisponibilidad oral, inactivación hepática y excreción renal (Abdelrahman y cols., 1993).

Otra estrategia se ha dirigido hacia el uso de antagonistas no peptídicos de receptores de angiotensina como el losartan y el valsartan que han demostrado una alta eficacia en la reducción de la presión arterial al ser oralmente activos, específicos y altamente selectivos sobre el receptor AT_1 de la angiotensina (Criscione y cols., 1995).

La idea de que la alteración de las peptidasas contribuye a la patogénesis de la hipertensión ya fue sugerida hace años (Hickler y cols 1963). Recientemente, se ha estudiado la inhibición del ECA mediante el uso de inhibidores de la metaloendopeptidasa (Carretero y Sicili, 1991). También se ha dirigido la atención hacia la inhibición de las AP A y B. Dos de estos inhibidores, la amastatina y la bestatina han demostrado inhibir selectivamente AP de membrana (Umezawa y

cols. 1976). Específicamente, la amastatina inhibe a la AP A (Aoyagi y cols, 1978) y la bestatina inhibe la AP B (Umezawa y cols, 1976). Ambos, amastatina y bestatina, inhiben también a la AP M que es capaz de romper la unión Asp-Arg de la Ang II, y especialmente la unión Arg-Val de la Ang III (Rich y cols, 1984; Wright y cols, 1991).

4. Dieta y Esteroides Sexuales

4. DIETA Y ESTEROIDES SEXUALES

4.1. Dieta, Esteroides Sexuales y Fertilidad

Parece existir un acuerdo con relación a que la dieta en general y la composición de ácidos grasos en particular, modifican los niveles de esteroides sexuales y afectan a la fertilidad de mamíferos y aves. Sin embargo, los resultados son aparentemente contradictorios y los mecanismos que subyacen a estos efectos permanecen aún poco conocidos.

Estudios recientes en animales demuestran que el número de espermatozoides por eyaculado disminuye en aves alimentadas con una dieta rica en aceite de maíz, pero este efecto se revertía cuando los animales se alimentaban con una dieta enriquecida en aceite de pescado (Surai y cols, 2000). La alimentación de ratas con dietas ricas en colesterol o aceite de pescado aumentan la testosterona basal y la síntesis de testosterona estimulada por LH en comparación con ratas alimentadas con una dieta baja en colesterol que contenga aceite de linaza (Sebokova y cols, 1990). Además, la alteración en la dieta de la concentración y el porcentaje entre los ácidos grasos poliinsaturados n-6 y n-3 puede influir en la síntesis y metabolismo de eicosanoides y afectar a la fertilidad de ratas macho (Abayasekara y Wathes, 1999).

También se ha demostrado que la composición de grasa en la dieta influye en la composición de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas testiculares de rata (Sebokova y cols, 1990). La modificación de la composición y propiedades físicas de la membrana puede conducir a modificaciones en la actividad de los enzimas asociados a membrana (Muriana y cols, 1992) y a alteraciones en las propiedades de unión de los receptores de gonadotropinas (Sebokova y cols, 1988). Por otro lado, en gallos se ha analizado el efecto que sobre la fertilidad tiene el uso de una dieta rica en aceite de salmón y otra rica en aceite de maíz. Los resultados demostraron que la dieta rica en aceite de salmón mostraba significativamente mayores tasas de fertilidad que la rica en aceite de maíz (Blesbois y cols, 1997). Por último, un estudio reciente ha analizado el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la dieta (dietas enriquecidas con aceite de linaza y de habas) sobre diversos parámetros reproductivos en terneras lactantes. Los resultados han demostrado una reducción de la progesterona plasmática en el inicio de la fase lútea con los dos tipos de aceites. Los animales alimentados con aceite de linaza

incrementaron los niveles de estradiol durante la fase folicular, todo lo cual sugiere que el uso de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta puede influir en la función ovárica y uterina de terneras (Robinson y cols, 2002).

Los estudios que se han llevado a cabo en humanos demuestran una heterogeneidad en los resultados, algunos de ellos aparentemente contradictorios. Se ha descrito una correlación inversa entre el grado de insaturación de la grasa y los niveles de testosterona. Así, la ingesta de aceite de pescado se ha relacionado inversamente con los niveles de testosterona total (Nagata y cols, 2000). Por otro lado, el uso de una dieta rica en grasa saturada, reductora de quilomicrones postprandiales, da lugar a una reducción prolongada de testosterona que no se ve afectada por la reducción postprandial de quilomicrones (Volek y cols, 2001). Sin embargo, otros autores también encuentran una reducción en los niveles de testosterona tras una alimentación baja en grasa animal (Habito y Ball, 2001).

Otros autores han estudiado el posible efecto del contenido de grasa en la dieta y el porcentaje entre

ácidos grasos poliinsaturados y saturados (P/S). Durante seis semanas se alimentó a voluntarios con una dieta baja en grasa y un alto porcentaje P/S (1.22). Los resultados demostraron una reducción en suero de androstediona, testosterona y testosterona libre (Hamalainen y cols, 1984). Reed y cols (1987) demostraron que después de consumir durante dos semanas una dieta con alto contenido en grasa, los niveles de colesterol aumentaron mientras que disminuyeron los de sex-hormone binding globuline (SHBG). En contraste, cuando se cambió la dieta por una baja en grasa, los niveles de colesterol disminuyeron y los de SHBG aumentaron. El incremento de SHBG se asoció con un descenso de testosterona.

Meikle y cols (1990) al día siguiente de una dieta rica en grasa también demuestran una reducción de testosterona en plasma y sugieren que esta reducción no afecta a la LH por lo que la modificación de los niveles de testosterona sería debido a la acción de los ácidos grasos a nivel testicular. Field y cols (1994) estudiaron la relación entre la dieta y los niveles plasmáticos de diversos esteroides sexuales y cortisol. Los resultados les demostraron que las únicas hormonas asociadas con los lípidos de la dieta fueron dihidrotestosterona, cortisol y SHBG.

Finalmente y en contraste con la mayoría de los autores, Dorgan y cols (1996) tras evaluar el efecto de la grasa sobre las hormonas sexuales en plasma y orina observaron que la concentración de testosterona total y de SHBG aumentaron tras consumir una dieta alta en grasa durante 10 semanas.

4.2. Esteroides Sexuales e Hipertensión

En el ser humano, existen diferencias sexuales en la presión arterial que se hacen evidentes a partir de la adolescencia y persisten durante la edad adulta. En edades inferiores a los 60 años, la presión arterial (PA) sistólica y diastólica es mayor en

hombres que en mujeres. Después de esta edad, o bien tras la menopausia, la PA, particularmente la sistólica, aumenta en las mujeres apareciendo entonces entre ellas mayor frecuencia de hipertensión que llega a equipararse en incidencia con la de los hombres. Por lo tanto, la presencia o ausencia de las hormonas ováricas pueden ser respectivamente la responsable en parte de la menor PA en premenopáusicas y de la mayor PA en postmenopáusicas.

De manera similar a los humanos, en los animales también existen diferencias sexuales en la presión arterial. Por ejemplo, en comparación a las hembras, las ratas macho espontáneas hipertensas, ratas Dahl hipertensas, ratas hipertensas sal- acetato desoxicorticosterona y ratas genéticamente hipertensas de Nueva Zelanda tienen mayores niveles de PA. En estos modelos de hipertensión, la PA se reduce por castración pero no aumenta con la ovariectomía. Por lo tanto, diferencias sexuales en la PA pueden también ser debidas a cambios en las hormonas testiculares (Dubey y cols, 2002). Sin embargo, hasta el momento no hay estudios concluyentes que demuestren diferencias en la PA entre ratas macho y hembra normotensas (Reckelhoff, 2001), habiéndose incluso descrito resultados contradictorios dependiendo de la edad en la que se realizó el estudio (Calhoun y cols., 1995).

4.2.1. Estrógenos, Profestágenos e Hipertensión

Tras la menopausia existe un incremento significativo de la presión arterial. Puesto que la menopausia se asocia con un descenso en la síntesis de estradiol, es probable que los cambios en la PA sean debidos en parte a esta circunstancia (Staessen y cols, 1997). También apoya la idea de que el estradiol es un agente depresor de la PA en la mujer, el hecho de que durante el ciclo menstrual, la PA es menor durante la fase lútea (cuando los niveles de estradiol están aumentados) que durante la fase folicular (Dunne y cols, 1991). Otras observaciones llevadas a cabo durante el embarazo también aportan datos a favor del efecto depresor del estradiol sobre la PA, ya que los niveles de estradiol aumentan entre 50 y 180 veces durante el embarazo y ese aumento se asocia con una disminución significativa de la PA (Siamopoulos y cols, 1996). Además, en consonancia con los planteamientos anteriores, si el estradiol endógeno disminuye la PA, sería lógico pensar que la administración de preparados estrogénicos también reduciría la PA. Sin embargo, en este sentido los datos son poco consistentes ya que se han descrito disminuciones, aumentos, así como efectos neutros sobre la PA (Dubey y cols, 2002). En este sentido, estudios recientes indican que la terapia estrogénica sustitutiva tras la menopausia o no afecta (Lloyd y cols, 2000) o produce un descenso en la PA (Cagnacci y cols, 1999).

En relación al efecto del estradiol sobre el tono vascular, se han demostrado receptores estrogénicos en el endotelio vascular y está bien establecido que el estradiol produce vasodilatación (Dubey y Jackson, 2001). Este efecto podría ser en parte mediado por la generación de óxido nítrico (ON) a partir del endotelio y a

su vez el efecto se atenúa mediante la administración de inhibidores de la síntesis de ON (Chen y cols, 1999). Sin embargo, la progesterona inhibe la síntesis de ON inducida por el estradiol, lo cual puede contribuir a la disminución del efecto vasodilatador de los estrógenos en postmenopáusicas que reciben simultáneamente estradiol y progesterona (Xiao y cols, 2001). El estradiol también produce vasodilatación coronaria porque induce la apertura de canales de K⁺ activados por calcio (White y cols, 1995) y reduce la síntesis de potentes vasoconstrictores como Angiotensina II (Schunkert y cols, 1997), catecolaminas (Pasqualini y cols, 1991) y endotelina-1 (Ylicorkala y cols, 1995).

En relación al crecimiento vascular, no hay duda de que el estradiol inhibe intensamente la respuesta vascular a la lesión mediante múltiples mecanismos entre los que cabe destacar el bloqueo de la respuesta inflamatoria, la inhibición de la llegada de macrófagos, linfocitos y trombocitos a la zona lesionada, o la inhibición de la adhesión plaquetaria. El efecto protector vascular del estradiol puede atenuar el desarrollo de la hipertensión y además puede proteger a los vasos del efecto perjudicial de una alta presión arterial (Dubey y Jackson, 2001; Mendelson y Karas, 1999).

Por otro lado, el estradiol modula la síntesis de factores circulantes importantes en la estructura y tono vascular. Por ejemplo, el estradiol estimula la síntesis de bradicinina reduciendo por tanto la PA (Sumino y cols, 1999). El estradiol reduce la expresión del enzima convertidor de angiotensina (ECA) en suero y en la pared vascular y además disminuye la liberación de renina y la formación de Ang II (Schunkert y cols, 1997). También reduce la expresión de receptores AT1 en células musculares lisas (Nickenig y cols, 1998) y estimula la formación de Ang 1-7 a la que se le ha sugerido un papel vasodilatador e inhibidor de del crecimiento del músculo liso (Brosnihan y cols, 1997). Finalmente, la síntesis del potente vasoconstrictor endotelina-1 está inhibida por el estradiol (Dubey y cols, 2001).

El riñón juega un papel esencial en la regulación de la PA y diversas patologías renales están implicadas en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. El defecto común en la hipertensión es un desplazamiento a la derecha en la relación presión-natriuresis (Hall y cols, 1990). Se ha descrito que las ratas macho tienen una tasa de filtración glomerular menor y desarrollan daño glomerular, incluyendo glomeruloesclerosis, en edades más tempranas que las ratas hembra (Reckelhoff, 2001). Puesto que el correcto funcionamiento glomerular es esencial para la hemodinámica renal y la regulación de la PA, las observaciones anteriores sugieren que el estradiol ayuda a mantener normal la PA mediante un efecto protector renal. El estradiol reduce la síntesis de diversos factores que inducen glomeruloesclerosis y aumento de la PA. Tal es el caso de la reducción en la síntesis local renal de Ang II (Gallagher y cols, 1999) y de endotelina-1 (Morey y cols, 1998). Además, existen diferencias de género en la respuesta renal a la deshidratación (Prieto y cols, 2002) lo que apoya la existencia de diferencias sexuales en la regulación del balance hídrico (Swenson y Sladex, 1997) y consecuentemente en la regulación de la PA. En condiciones de deshidratación, las ratas macho, pero no las hembras, reducirían el catabolismo de la Ang II a nivel medular renal lo que permitiría una acción más prolongada de éste péptido en tales condiciones, aumentando por

tanto la reabsorción renal de agua en los machos deshidratados pero no en las hembras (Prieto y cols, 2002).

Finalmente, en relación al efecto del estradiol, hay evidencias de que inhibe el sistema nervioso simpático en modelos animales de hipertensión (Vongpatanasin y cols, 2001).

En general, con respecto a los efectos de los progestágenos, los datos obtenidos de seres humanos y de estudios animales sugieren que la progesterona tiene efectos neutros o depresores sobre la PA (Kristiansson y Wang, 2001) induciendo vasodilatación entre otros efectos (Miller y Vanhoutte, 1991).

4.2.2. Andrógenos e Hipertensión

A diferencia del efecto de los estrógenos sobre la PA, relativamente poco es lo que se conoce sobre la influencia de los andrógenos en la PA y en las enfermedades cardiovasculares. Algunos estudios han descrito la reducción o no modificación de los niveles de testosterona en hombres hipertensos así como en pacientes con enfermedad coronaria o infarto de miocardio. Estos estudios sugieren que éstas patologías están asociadas con un descenso de andrógenos, más que con un incremento. Sin embargo, tales estudios podrían sólo reflejar un descenso de testosterona debido a una situación de estrés ya que se ha descrito un descenso de ésta hormona ante diversas condiciones de estrés (Kalin y Zumhoff, 1990). Por lo tanto, bajos niveles de testosterona en pacientes hipertensos o con enfermedad cardiovascular pueden no ser indicativos de que la testosterona es un reductor de la PA y un protector cardiovascular.

En contraste, diversos estudios en animales sugieren que la testosterona es un agente hipertensivo. La PA es mayor en ratas macho espontáneas hipertensas, ratas Dahl y ratas hipertensas acetato de desoxicorticosterona-sal que las hembras. La castración de éstos animales en edades tempranas atenúa el desarrollo de la hipertensión. Además, el tratamiento de hembras normotensas ovariectomizadas o machos castrados con testosterona incrementa la presión arterial a niveles similares a machos normales y también, la testosterona incrementa la PA en hembras espontáneas hipertensas ovariectomizadas (Reckelhoff, 2001).

Se han descrito diversos mecanismos por los que la testosterona puede incrementar la PA. La testosterona incrementa los niveles circulantes de homocisteína. La homocisteína induce daño endotelial favoreciendo así el desarrollo de la arteriosclerosis y daña también las células endoteliales glomerulares (Gilaty y cols, 1998). En contraste con el estradiol, la testosterona incrementa los niveles de endotelina-1 (Gilaty y cols, 1998). Finalmente, en machos espontáneos hipertensos, la hipertensión se asocia con altos niveles de catecolaminas y la castración reduce los niveles de éstas a los de los controles de normotensos sugiriendo que la testosterona puede inducir directamente la síntesis de catecolaminas (Kumai y cols, 1995).

Con respecto al tono vascular, se ha descrito que la testosterona puede activar tanto vasoconstricción como vasodilatación. El balance entre ambos efectos determinará el efecto neto sobre el tono vascular y quizá sobre la PA. Los efectos variables anteriormente descritos podrían ser debidos a esta inconsistente acción de la testosterona sobre la pared vascular (Dubey y cols, 2002).

Sobre el corazón, la testosterona y su metabolito dihidrotestosterona inducen hipertrofia cardíaca en parte a que activan una mayor expresión de receptores androgénicos en los miocitos cardíacos. Además, estudios *in vitro* demuestran que los andrógenos inducen un mayor crecimiento de miocitos en cultivo sugiriendo un efecto directo sobre el crecimiento. El efecto hipertrófico de la dihidrotestosterona, pero no de la testosterona, parece asociado a un aumento en la síntesis de péptido natriurético auricular, todo lo cual indica que el efecto hipertrófico de los andrógenos se debe a una multiplicidad de mecanismos (Marsh y cols, 1998).

A nivel renal se ha descrito que durante el envejecimiento, en comparación con las hembras, las ratas macho demuestran un mayor descenso en la tasa de filtración glomerular, desarrollan un mayor daño glomerular, mayor glomeruloesclerosis, proteinuria y presentan un mayor incremento en la presión arterial (Reckelhoff, 2001). La castración en edades tempranas atenúa el daño renal y previene el desarrollo de la hipertensión. Sin embargo, la administración de testosterona a los animales castrados aumenta la PA a los mismos niveles que los animales normales (Reckelhoff, 2001). Los riñones expresan receptores para andrógenos lo que sugiere que éstos efectos sean mediados por ellos (Reckelhoff y Granger, 1999).

Otro mecanismo clave por el cual los andrógenos inclinan el sistema cardiovascular hacia un estado que favorezca la hipertensión es desplazando la relación presión-natriuresis hacia la derecha. A presiones de perfusión renal comparables, los machos espontáneos hipertensos y las hembras ovariectomizadas que reciben un tratamiento crónico de testosterona, excretan menor sodio y agua que las hembras normales, hembras ovariectomizadas o machos castrados (Reckelhoff y Granger, 1999). Estos efectos podrían ser mediados por el sistema renina-angiotensina debido a que la testosterona incrementa los niveles plasmáticos de renina (Reckelhoff, 2001), la castración de ratas macho disminuye la actividad de renina plasmática y la administración de testosterona a hembras ovariectomizadas aumenta la actividad de renina, siendo este un efecto dosis-dependiente (Reckelhoff, 2001). Por lo tanto, estos estudios en animales aportan serias evidencias de que la testosterona disminuye la propiedad de los riñones de excretar sal y por tanto predispone a la hipertensión (Dubey y cols, 2002).

II. Objetivos

OBJETIVOS

El nivel circulante o tisular de un determinado péptido, es el resultado de un equilibrio entre su secreción y degradación. Así, el estado funcional de estos péptidos bioactivos depende no sólo de su secreción sino también de su inactivación o procesamiento mediante la acción de enzimas proteolíticos tales como las aminopeptidasas (AP). Estos enzimas juegan un importante papel en la regulación del SRA (Barret y cols. 1998), de las hormonas OX y VS (Itoh y Nagamatsu 1995) y de la TRH (Cummins y O'Connor 1998).

Es bien conocido el hecho de que el incremento de grasa saturada en la dieta esta relacionado con un incremento en los niveles de colesterol en plasma y con niveles más altos de presión sanguínea. Por otro lado, la ingesta de ácidos grasos monoinsaturados ha sido propuesta como un factor dietético a considerar debido a su influencia sobre la incidencia de enfermedades cardiovasculares e hipertensión. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a este efecto son aún desconocidos.

Se ha sugerido que la composición grasa de la dieta influye sobre la función reproductora en varones (Surai y cols. 2000), en la composición en colesterol-fosfolípidos de las membranas plasmáticas testiculares de ratas (Sebokova y cols. 1988) y en el metabolismo de las prostaglandinas y la fertilidad (Abayasekara y Wathes 1999).

El objeto del presente estudio se centra en el estudio de diversas actividades proteolíticas, del tipo aminopeptidasa, implicadas en el control de la presión arterial (actividades angiotensinasa A o AP A, angiotensinasa M o AP M y degradativa de vasopresina o CysAP), y de la TRH (actividad degradativa de la TRH o pGluAP) en grupos experimentales de ratas alimentadas con dietas que difieren en el tipo y grado de saturación de la grasa que contienen (aceites de girasol, sésamo, pescado, oliva, coco y manteca de cerdo). Las actividades enzimáticas se determinaran en plasma y en distintos tejidos, centrales y periféricos, y tanto a nivel soluble como unido a membrana.

Nuestro propósito es establecer una relación funcional entre el tipo de grasa en la dieta, la regulación de la presión sanguínea y otras modificaciones fisiológicas que podrían estar influidas del mismo modo.

III. Material y Métodos

1. Materiales

1. MATERIALES

ANIMALES

Para la realización del presente estudio se utilizaron un total de 48 ratas macho de la raza Wistar con pesos comprendidos entre 100-150 gramos procedentes del animalario de la Universidad de Jaén. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones estándar de luz, humedad y temperatura, y tuvieron libre acceso tanto a la comida como al agua.

APARATOS

- Agitador magnético (A-06 serie H, SBS).
- Agitador de tubos (Reax 2000, Heildolph).
- Balanza de precisión (SBC 21, Scaltec).
- Baño termostatzado agitador (320 OR, Unitronic).
- Contador gamma multipozo (Berthold).
- Espectrofluorímetro (Cary Eclipse, Varian).
- Espectrofotómetro (Helyos, Unicam).
- Homogeneizador (RZR1, Heildolph).
- Lector de placas (Bio-Rad MD-550).
- Medidor de presión arterial (Letica 5000).
- pHmetro (MicroPH 2001, Crison).
- Rotor (Mod. 50Ti, Beckman).
- Rotor orbital (CD 3000445, JP Selecta SB).
- Ultracentrífuga (L7-75, Beckman)

PRODUCTOS QUÍMICOS

- Acetato sódico (Merck).
- Ácido acético (Merck).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)(Sigma).
- Ácido ortofosfórico (Merck).
- Ácido fosfotúngstico (Sigma).
- L-Alanil- β -Naftilamida (Sigma).
- Albúmina bovina. Fracción V (Sigma).
- L-Arginil- β -Naftilamida (Sigma).
- L-Aspartil- β -Naftilamida (Sigma).
- Bio-beads SM-2 (Bio-Rad).
- Cloruro cálcico anhídrico (Sigma).
- Cloruro de magnesio (Sigma).
- Coomasie G (Sigma).
- L-Cystinil- β -Naftilamida (Sigma).
- Dimetil sulfóxido (Sigma).
- D-L-Ditiotreitol (DTT) (Sigma).
- Equitensin.
- Etanol (Merck).
- Eter (Panreac)
- Fosfato dibásico (Merck).
- Fosfato monobásico (Merck).
- L-Glutanil- β -Naftilamida (Sigma).
- L-Piroglutanil- β -Naftilamida (Sigma).
- Tritón-X-100 (Sigma)
- Trizma base (Sigma).

DISOLUCIONES

TAMPÓN TRIS-HCl 0,2M pH 7,4

Para la preparación de 1000 ml, se toman 24,22 g de trizma base (Tris (hidroximetil) amino metano), disolviéndolo en agua destilada hasta alcanzar el volumen indicado. Se ajusta el volumen a pH 7,4.

TAMPÓN FOSFATO 0,1 M pH 7,4

Para obtener la solución de trabajo se mezclan 95 ml de Fosfato monobásico 0,2 M (34,2 g de fosfato monobásico en 1000 ml de agua destilada) con 405 ml de Fosfato dibásico 0,2 M (53,65 g de fosfato dibásico en 1000 ml de agua destilada) y se completa hasta 1000 ml con agua destilada.

TAMPÓN ACETATO 0,1 M pH 4,2

Para la preparación de la solución de trabajo se mezclan 368 ml de ácido acético 0,2 M (11,55 ml de ácido acético en 1000 ml de agua destilada) con 132 ml de acetato sódico 0,2 M. (16,4 g de acetato sódico en 1000 ml de agua destilada) y se afora hasta 1000 ml.

SOLUCIÓN PATRON DE ALBÚMINA (1 mg/ml)

Se pesan 100 mg de albúmina bovina y se disuelven en 100 ml de agua destilada.

EQUITENSIN

Para preparar 500 ml:

- Hidrato de cloral 21,25 g disueltos en 49,4 ml de etanol
- Nembutal 81 ml (4,86g en agua)
- Propilenglicol 198 ml
- Sulfato de Magnesio 10,64 mg

Se lleva a volumen con agua destilada.

SOLUCIÓN BRADFORD

- 100mg Coomasie G
- 50ml Etanol
- 100ml Acido Ortofosfórico
- 50ml Agua destilada

Se prepara una solución concentrada con el Coomasie G, el etanol, el ácido ortofosfórico y el agua destilada, luego se filtra. Para obtener la solución de trabajo, la solución anterior se diluye 5 veces.

REACTIVO PRECIPITANTE DE LIPOPROTEÍNAS

Se necesita preparar una disolución concentrada de ácido fosfotúngstico 0,55mmol/l y cloruro de magnesio 25 mmol/l, para ello debemos de tomar por cada ml de reactivo que necesitemos 1,6mg del ácido y 4,95mg del cloruro.

La solución de trabajo se diluye 4:1 con agua destilada.

Para la precipitación de lipoproteínas (Quilomicrones, VLDL y LDL) se añade a cada 200µl de muestra de plasma 500 µl del reactivo diluido.

2. Métodos

2. MÉTODOS

2.1. Grupos Experimentales y Dietas

Se utilizaron 48 ratas macho de la raza Wistar con pesos comprendidos entre 100-150 gramos. El cuidado y uso de los animales se llevo a cabo de acuerdo con la directiva europea 86/609/EEC. Fueron divididas en seis grupos de 8 ratas cada uno. A cada grupo se le administró dietas isocalóricas e isoproteicas que diferían únicamente en el tipo de grasa añadida (10%); aceite de girasol, sésamo, pescado (menhaden), oliva, coco y manteca de cerdo.

Las dietas cuya composición aparece descrita en la siguiente tabla, se preparaban una vez cada dos semanas y se mantenían en cámara fría y en oscuridad.

COMPOSICIÓN DE LAS DIETAS

	Aceite de Sésamo	Aceite de Girasol	Aceite de Pescado	Aceite de Oliva	Manteca de Cerdo	Aceite de Coco
Ingredientes (g/kg)						
Caseína	210	210	210	210	210	210
Metionina	3	3	3	3	3	3
Sacarosa	450	450	450	450	450	450
Maltodextrinas	137	137	137	137	137	137
Celulosa	50	50	50	50	50	50
Aceite de maíz	11	11	11	11	11	11
Aceite de sésamo	90	-	-	-	-	-
Aceite de girasol	-	90	-	-	-	-
Aceite de pescado	-	-	90	-	-	-
Aceite de oliva	-	-	-	90	-	-
Manteca de cerdo	-	-	-	-	90	-
Aceite de coco	-	-	-	-	-	90
Corrector Vit-Min	45	45	45	45	45	45
Cloruro de colina	4	4	4	4	4	4
Comp. Energética (%)						
Proteínas	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5	20.5
Carbohidratos	57.3	57.3	57.3	57.3	57.3	57.3
Lípidos	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2
Energía total (MJ/Kg)	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1	17.1

TABLA 3: Composición de las dietas experimentales.

Los animales se alimentaron con estas dietas experimentales durante 16 semanas durante las cuales se controlaban diariamente los niveles de ingesta de agua y alimento, y semanalmente el incremento de peso, nivel de presión arterial y frecuencia cardiaca.

A continuación, se expone una tabla con la composición en ácidos grasos, colesterol, fitoesteroles, y Vit E de cada tipo de grasa o aceite utilizado, según la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LAS DIETAS UTILIZADAS (contenido/100g)

ACIDOS GRASOS (g)	GIRASOL	SESAMO	PESCADO	OLIVA	MANTECA	COCO
Caproico 6:0	0	0	0	0	0	0,5
Caprílico 8:0	0	0	0	0	0	6,8
Cáprico 10:0	0	0	0	0	0,1	5,4
Láurico 12:0	0	0	0	0	0,2	40,1
Mirístico 14:0	0,1	0	7,2	0	1,2	15,1
Pentadecoico 15:0	0	0	1,1	0	0	0
Palmitico 16:0	6,5	9,2	14,8	11,1	22,6	8,6
Margarico 17:0	0	0	1,6	0	0,2	0
Esteárico 18:0	4,2	4,5	3,6	2,2	12,3	2,7
Araquídico 20:0	0,4	0,5	0,2	0,3	0	0
Behénico 22:0	0,5	0	0,1	0	0	0
Lignocérico 24:0	0,2	0	0,2	0	0	0
Saturados AGS	11,9	14,2	28,8	13,5	36,7	79,2
Palmitoleico 16:1	0,4	0,2	9,5	0,7	2,5	0
Oleico 18:1	20,2	38,0	15,7	67,9	39,7	7,9
Gadoleico 20:1	0,7	0,2	1,2	0,3	0,9	0
Erúcido 22:1	0	0	0,3	0	0	0
Monoinsat. AGM	21,3	38,4	26,7	69,0	43,3	7,9
Linoleico 18:2	65,5	43,6	8,3	13,5	15,6	8,0
Araquidónico 20:4	0	0	1,1	0	0,2	0
Total w6	65,5	43,6	9,4	13,5	15,6	8,0
Linolénico 18:3	0,4	0,4	1,4	0,6	1,0	0,1
Estearidónico 18:4	0	0	2,5	0	0	0
Timnodónico 20:5	0	0	11,9	0	0	0
Clupandónico 22:5	0	0	4,4	0	0	0
Cervónico 22:6	0	0	7,7	0	0	0
Total w3	0,1	0,4	21,1	0,6	1,0	0,1
Poliinsat. AGP	65,9	44,0	37,2	14,0	16,5	8,1
AGP / AGS	5,5	3,1	1,5	1,0	0,6	0,5
AGP+AGM / AGS	7,4	5,8	2,5	6,2	1,3	0,8
Omega6/Omega3	164,8	128,5	9,2	21,0	18,3	9,1
OTROS COMPONENTES (mg)						
Colesterol	0,0	0,0	468,9	0,0	85,5	0,0
Vitamina E	47,9	6,0	2,3	13,5	3,4	2,6
α-Tocoferol	42,0	2,8	1,6	12,3	2,7	1,6
Fitoesteroles	196,5	885,0	106,5	305,4	106,5	183,9

TABLA 4: Composición lipídica de las dietas (89% aceite experimental + 11% aceite de maíz)

2.2. Obtención de las Muestras

Pasadas las 16 semanas sometidas a dieta experimental, los animales se mantuvieron en ayuno 12 horas antes del sacrificio. Se anestesiaron con equitensin (2 ml/kg peso corporal) y se procedió a la extracción de las muestras de sangre por punción en el ventrículo izquierdo. Las muestras del resto de tejidos (corteza y médula renal, testículo, hipotálamo, corteza frontal, aorta, aurícula y ventrículo) se obtuvieron por disección, previa perfusión con solución salina (CINa 9 ‰) vía sanguínea a través del ventrículo izquierdo. Las muestras de tejido fueron rápidamente congeladas y mantenidas a -80°C hasta su utilización.

2.3. Preparación de las Muestras

A las muestras de sangre se les añadió EDTA como anticoagulante y se centrifugaron a 2000g durante 10 min. para obtener el plasma, en el cual se midieron los niveles de proteína, triglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, testosterona, dihidrotestosterona, estradiol y de actividad aminopeptidásica.

Para obtener la fracción soluble, las muestras de tejido fueron homogeneizadas con 1/2 ml de tampón tris-HCl 10 mM (pH 7,4) y ultracentrifugadas a 100.000 g durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se usaron para medir la actividad enzimática soluble de Ala-AP, Arg-AP, Cys-AP, Glu-AP, Asp-AP y pGlu-AP y el contenido en proteínas solubles.

Para solubilizar las proteínas de membrana, los sedimentos se rehomogeneizaron en tampón Tris-HCl 10 mM. (pH 7,4) con triton-X-100 al 1%. Después se ultracentrifugó (100.000 g, 30 min., 4°C). Con el fin de retirar el detergente, a los sobrenadantes obtenidos se les añadió un adsorbente polimérico, bio-beads SM-2 (100 mg/ml) y se mantuvieron en el rotor orbital durante 2 horas dentro de una cámara frigorífica (4°C) para evitar la inhibición del detergente sobre las actividades enzimáticas (Alba y cols.1995).

Las muestras resultantes, tras la extracción de los bio-beads SM-2, se usaron para medir la actividad enzimática unida a membrana de Ala-AP, Arg-AP, Cys-AP, Glu-AP, Asp-AP y pGlu-AP y el contenido en proteínas unidas a membrana.

2.4. Determinación de Colesterol y Triglicéridos

Se determinó el colesterol de las distintas fracciones lipoprotéicas en plasma, HDL y LDL, por separado. Para ello, se procedió antes a su separación por precipitación con ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio. Con este método precipitan las lipoproteínas que contienen apoB (quilomicrones, VLDL, LDL y Lp_a) quedando en el sobrenadante las lipoproteínas HDL. Posteriormente se cuantifica el colesterol total

y el del sobrenadante (coHDL) por el método enzimático CHOD-PAP mediante un kit de la casa Sigma. A continuación se procede a calcular el colesterol-LDL mediante la fórmula de Friedewald:

$$\text{coLDL} = \text{coTOTAL} - (\text{TGL}/5) - \text{coHDL}$$

Los triglicéridos del plasma se cuantificaron por un método enzimático basado en la reacción de Buccolo y David mediante un kit de la casa Sigma.

2.5. Determinación de Hormonas Esteroideas

Los valores de **testosterona y estradiol** se determinaron por radioinmunoanálisis (RIA). Se hace reaccionar una cantidad fija de hormona marcada con una cantidad fija de anticuerpo formándose un complejo hormona marcada-anticuerpo. Al mismo tubo se añade una cantidad de hormona no marcada (suero o estándar) que compite con la hormona marcada en la formación del complejo. De esta manera la radioactividad del complejo hormona-anticuerpo desciende en proporción inversa a la cantidad de hormona no marcada que existe en el medio. Esto se utiliza para calcular la cantidad de hormona existente en la muestra problema por comparación con los resultados obtenidos de la curva estándar cuyos valores de hormona no marcada son conocidos.

A cada tubo se añaden 50ul de estándar o muestra y 500ul de hormona marcada radioactivamente. Se deja incubar 3h a 37°C. Luego se separa la hormona libre de la unida al complejo y se cuenta la radioactividad en un contador de radiación gamma. Cada muestra de estándar y problema se realiza por duplicado, se realiza la media y se calcula la fracción B/B0 siendo B las cuentas de radioactividad obtenidas en cada tubo y B0 las del punto cero de la curva estándar cuya concentración de hormona no marcada es 0. Los valores de hormona en los sueros problema se obtienen por interpolación en la curva estándar. Los materiales utilizados fueron suministrados por la casa Dia Soria (Vercelli, Italia).

Las determinaciones de **dihidrotestosterona (DHT)** se realizaron mediante ELISA. A cada pocillo de una placa recubierta se añaden 50ul de estándar o problema y 100ul de anticuerpo anti-DHT y se deja incubar a Tª ambiente durante 1 hora. Posteriormente se añade TBM para producir la reacción colorimétrica y pasados 30 minutos una solución reductora que para la reacción y permite su lectura en el lector de placas a 450nm. Los valores de hormona en la muestra problema se obtienen por interpolación en la curva estándar de concentraciones conocidas. Los materiales utilizados fueron suministrados por la Diagnostic Biochem Canada Inc., Ontario, Canada (disponen del anticuerpo específico para la DHT) (Rodriguez-Aleman y cols. 2000).

2.6. Determinaciones Enzimáticas

- Las actividades enzimáticas solubles y unidas a membrana de **Ala-AP, Arg-AP, Cys-AP, Glu-AP, Asp-AP y pGlu-AP**, se midieron fluorimétricamente, utilizando como sustratos L-Ala- β -NA, L-Arg- β -NA, L-Cys- β -NA, L-Glu- β -NA, L-Asp- β -NA y L-pGlu- β -NA respectivamente, de acuerdo con el método de Greenberg (1962), modificado por Alba y cols. (1989) y los métodos modificados de Tobe y cols (1980) (para Glu-AP), Cheung y Cushman (1971) (para Asp-AP) y Schwabe y McDonald (1977) (para pGlu-AP).

Se utilizaron placas negras de 96 pocillos, en cada pocillo se pipetearon 20 ó 50 μ l de muestra (según se midiese actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, ó ; GluAP, AspAP, pGluAP) que se incubaron durante 30 min. a 37°C en 100 μ l de las soluciones sustrato (ver tabla 5). A los 30 min. de incubación, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 100 μ l de tampón acetato 0,1 M (pH 4,2). La b-NA liberada como resultado de la actividad enzimática, se cuantificó fluorimétricamente a 412 nm de emisión con una excitación de 345nm.

Los valores obtenidos se transformaron en pmoles de β -NA liberada, mediante la extrapolación a una recta previamente obtenida tras la determinación de concentraciones decrecientes de β -NA en un medio de solución igual al de la solución sustrato, más 100 μ l de tampón acetato 0,1 M., pH 4,2. La actividad soluble y unida a membrana de Ala-AP, ArgAP, Cys-AP, Glu-AP, Asp-AP y pGlu-AP se expresó como pmoles de L-Ala- β -NA, L-Arg- β -NA, L-Cys- β -NA, L-Glu- β -NA, L-Asp- β -NA y L-pGlu- β -NA hidrolizados por min. y por mg de proteína.

SOLUCIONES SUSTRATO

	COMPONENTES	TAMPÓN
Ala-AP	L-Ala- β -NA 3,35mg/100ml	Fosfato 50mM (pH 7,4)
	Albúmina bovina 10mg/100ml	
	DTT 10mg/100ml	
Arg-AP	L-Arg- β -NA 3,35mg/100ml	Fosfato 50mM (pH 7,4)
	Albúmina bovina 10mg/100ml	
	DTT 10mg/100ml	
Cys-AP	L-Cys- β -NA 5,63mg/100ml	Tris HCl 50mM (pH 6)
	Albúmina bovina 10mg/100ml	
	DTT 10mg/100ml	
Glu-AP	L-Glu- β -NA 2,72mg/100ml	Tris HCl 50mM (pH 7,4)
	Albúmina bovina 10mg/100ml	
	DTT 10mg/100ml	
Asp-AP	L-Asp- β -NA 2,58mg/100ml	Tris HCl 50mM (pH 7,4)
	Albúmina bovina 10mg/100ml	
	MnCl ₂ 39,4mg/100ml	
pGlu-AP	L-pGlu- β -NA 2,58mg/100ml	Tris HCl 50mM (pH 7,4)
	Albúmina bovina 10mg/100ml	
	DTT 10mg/100ml	

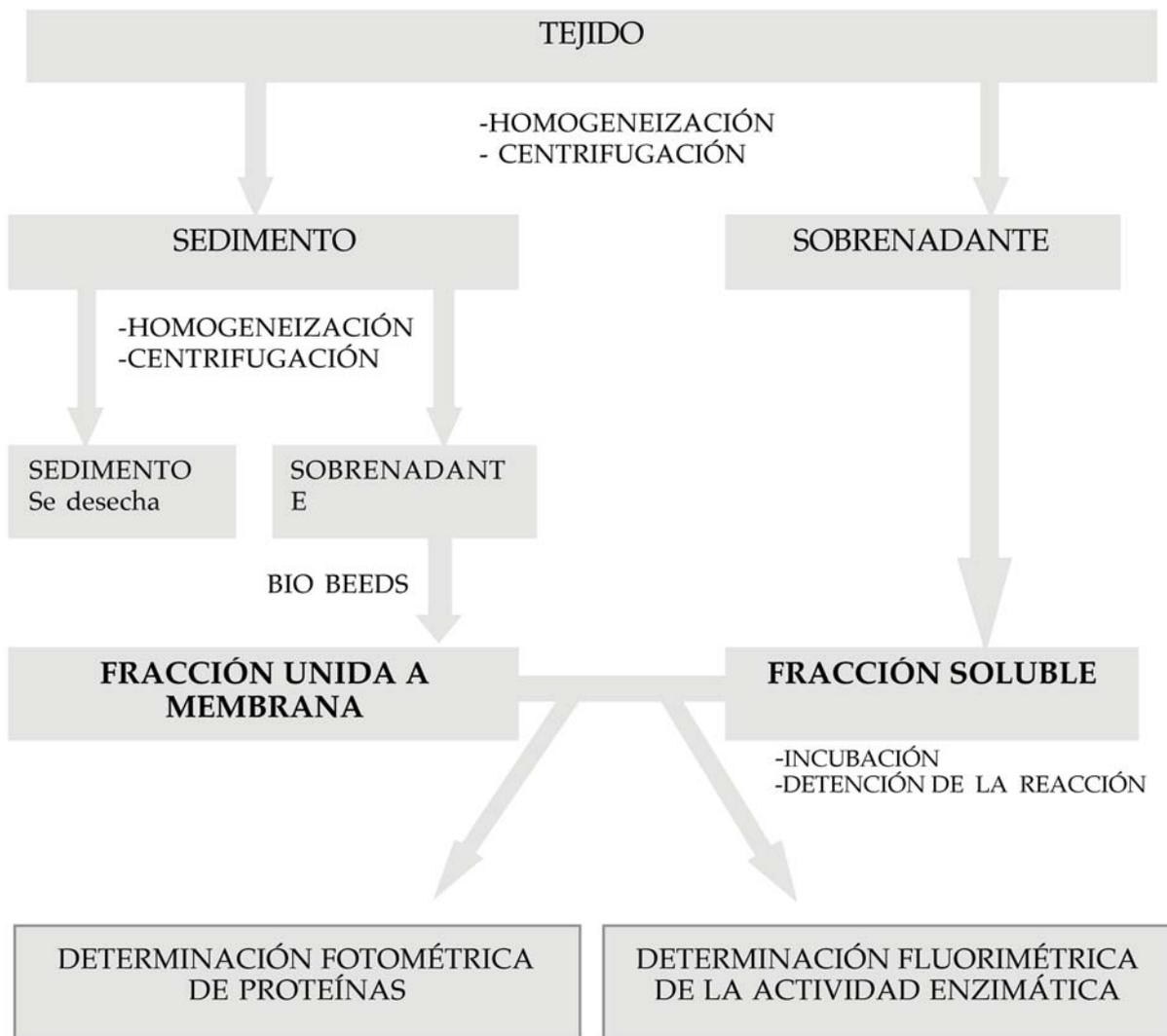
TABLA 5. Composición de las soluciones sustrato utilizadas para las determinaciones enzimáticas.

2.7. Determinación de Proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976), basado en la afinidad de un colorante (Coomasie azul brillante) por las proteínas. La unión del colorante a las proteínas produce un cambio en la longitud de onda de absorción

de aquel, que se puede medir espectrofotométricamente a 595 nm. Para realizar la curva patrón se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como estándar.

Los procedimientos seguidos para el procesamiento de las muestras y las posteriores determinaciones enzimáticas y de contenido en proteínas se esquematizan en la figura:



2.8. Preparaciones Histológicas de la Aorta

Tras la disección del animal, se cortó aproximadamente 1 cm del cayado aórtico de cada animal, y se mantuvo una noche en fijador (formaldehído 4% en tampón PBS). Posteriormente se lava en PBS y se pasa por una serie creciente en concentración de Etanol (70°, 80°, 90°, absoluto; 30 minutos en cada solución), se mantuvo una noche en xileno, y se incluyó en parafina.

Los bloques de parafina se cortaron con un microtomo a 10-20mm, luego se procede al montaje en portas y a su desparafinado e hidratado en soluciones decrecientes de alcohol para su posterior tinción con hematoxilina-eosina. Por último se procede a su análisis microscópico para determinar la existencia o ausencia de lesiones ateroscleróticas.

2.9. Análisis Estadístico

El estudio de las variaciones en la actividad AP y en los niveles de los demás parámetros analizados entre los seis grupos de animales se realizó estableciendo un modelo de ANOVA de una vía (ANOVA I). Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos (** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$).

Para comparaciones posteriores entre medias se utilizó el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico Statistical Graphics System (STATGRAPHICS).

IV. Resultados

1. CAMBIOS EN LOS VALORES DE PESOS E INGESTA DE AGUA Y ALIMENTO

- (Tablas 6 y 7) No se hallan diferencias significativas al comparar los pesos corporales de los distintos grupos de animales durante todo el proceso experimental, ni de los pesos del corazón, riñón y cerebro obtenidos tras el sacrificio. Si se observa un aumento de peso de los hígados de las ratas alimentadas con aceite de girasol, si las comparamos con el grupo de sésamo ($p < 0,01$).

- (Tablas 8, 9 y 10) Durante la 4ª semana el grupo de girasol alcanzó mayores niveles de ingesta de alimento al compararlos con los de pescado ($p < 0,05$), y durante la 16ª semana fueron los animales alimentados con aceite de coco los que alcanzaron mayores niveles de ingesta al compararlos con los grupos de sésamo, girasol, pescado y manteca ($p < 0,01$). La ingesta de agua fue mayor durante la 13ª semana en el grupo de sésamo al compararlo con el de manteca de cerdo ($p < 0,05$). Si tenemos en cuenta los valores medios de ingesta de agua durante todo el experimento, obtenemos diferencias significativas con los grupos de pescado, oliva y manteca que alcanzan niveles menores al compararlos con el de girasol, y el de manteca de cerdo al compararlo con el de sésamo ($p < 0,001$). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los valores de ingesta energética diaria y eficiencia en el uso de la energía.

2. CAMBIOS EN LOS VALORES DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA

- (Tabla 11) La presión arterial alcanzó mayores valores en las ratas alimentadas con aceite de coco durante la 7ª semana que las alimentadas con aceite de pescado ($p < 0,05$), durante la 11ª semana fueron mayores los valores obtenidos con el grupo de girasol al compararlo con los de pescado y manteca de cerdo ($p < 0,05$), y durante la semana 17ª los grupos de pescado y manteca de cerdo siguieron obteniendo los valores más bajos de presión arterial al compararlos con el resto de grupos experimentales ($p < 0,001$). Al tener en cuenta los valores medios de presión arterial durante todo el proceso, se obtienen diferencias significativas al comparar el grupo de pescado que alcanza niveles menores que los grupos de girasol, oliva y coco ($p < 0,01$).

- (Tabla 12) Durante la 3ª semana se alcanzaron mayores valores de frecuencia cardiaca en el grupo de girasol al compararlos con los de oliva, manteca de cerdo y

coco ($p < 0,01$), durante la 5ª semana fue el grupo de manteca de cerdo el que obtuvo mayores niveles de frecuencia cardiaca al compararlo con el de oliva ($p < 0,05$).

3. CAMBIOS EN LOS NIVELES DE LOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS ANALIZADOS.

- (Tabla 13) Los niveles de colesterol total fueron más bajos significativamente en las ratas alimentadas con aceite de pescado y manteca de cerdo al compararlas con el resto de las grasas ($p < 0,001$). Si nos referimos al porcentaje de colesterol-LDL frente al colesterol total los valores menores siguen siendo para el grupo de manteca de cerdo, siendo los valores más altos los del grupo de sésamo ($p < 0,001$). Y si atendemos a la fracción de colesterol unida a HDL frente al colesterol total, los valores más altos significativamente son los del grupo de manteca de cerdo frente al resto de los grupos ($p < 0,001$).

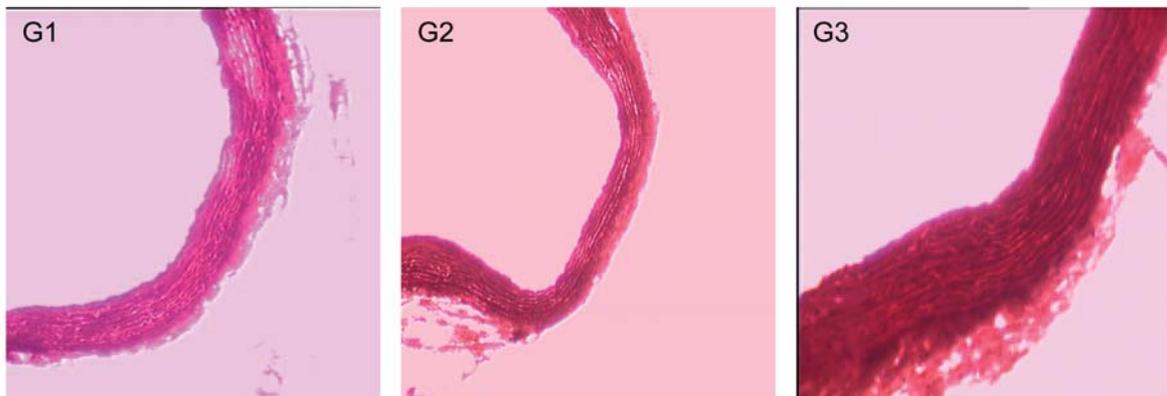
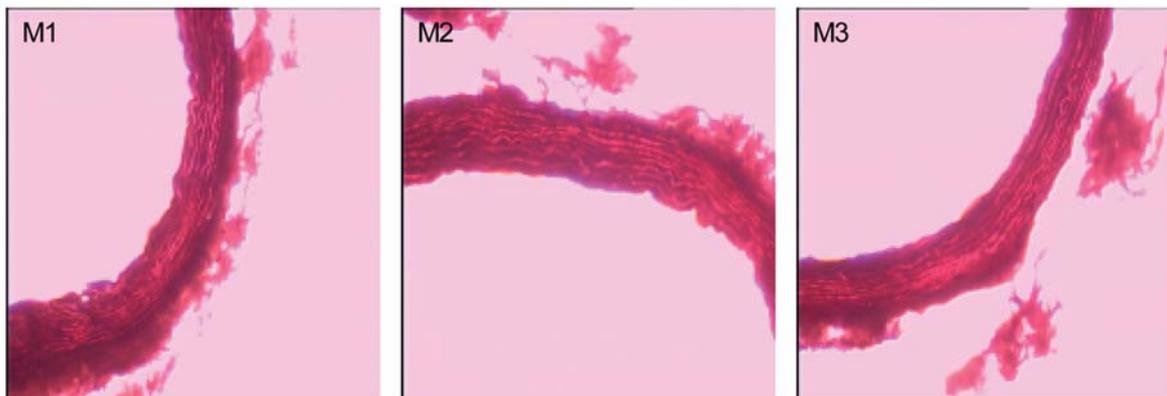
Los triglicéridos alcanzan los niveles más bajos con los grupos de ratas alimentadas con aceite de pescado y de sésamo ($p < 0,001$).

Respecto al nivel de hormonas sexuales; el grupo de manteca de cerdo alcanza los valores más altos de testosterona ($p < 0,01$), el grupo de oliva alcanza menor valor medio de estradiol que el grupo de coco ($p < 0,05$), y con los valores de dihidrotestosterona no se alcanzan diferencias significativas estadísticamente.

4. CORTES HISTOLÓGICOS DE LA AORTA

Por problemas en el procesamiento de las muestras, sólo conseguimos obtener buenos cortes de la aorta con los grupos de girasol y manteca de cerdo.

En las figuras que a continuación adjuntamos pueden observarse la no existencia de depósitos grasos en la pared arterial, ni de placas fibrosas, células espumosas u otros factores que indiquen el desarrollo del proceso aterosclerótico.

GIRASOL**MANTECA**

Figuras 6-11: Imágenes tomadas al microscopio óptico de distintas secciones del cayado aórtico de los grupos experimentales alimentados con aceite de girasol (G) y manteca de cerdo (M)

5. CAMBIOS EN EL NIVEL DE PROTEÍNAS EN PLASMA

- (Tabla 14) Los niveles medios de proteína plasmática fueron menores en el grupo de sésamo que en el resto de grupos ($p < 0,05$).

6. CAMBIOS EN LAS ACTIVIDADES AMINOPEPTIDASAS**ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN PLASMA**

- (Tabla 15) La actividad AlaAP es menor en el grupo de pescado que en el grupo de manteca de cerdo ($p < 0,01$). La actividad ArgAP es menor en los grupos de pescado y coco que en los de sésamo y manteca de cerdo ($p < 0,001$). La actividad

CysAP es menor en el grupo de sésamo que en girasol y manteca de cerdo ($p < 0,01$). Las actividades GluAP, AspAP y pGluAP alcanzaron menores niveles en los grupos de sésamo y pescado que en el resto de los grupos ($p < 0,001$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CORTEZA RENAL

- (Tabla 16) Sólo se encuentran diferencias significativas entre grupos con la actividad AspAP tanto en su forma soluble como en la unida a membrana: La actividad AspAPsol es mayor en el grupo de manteca si lo comparamos con el de oliva ($p < 0,05$) y la actividad AspAPmb es mayor en el grupo de pescado que en el de girasol ($p < 0,05$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN MÉDULA RENAL

- (Tabla 17) Las actividades AlaAP y CysAP solubles no muestran diferencias significativas entre grupos. La actividad ArgAPsol es mayor en el grupo de manteca que en el de girasol ($p < 0,05$). La actividad GluAPsol alcanza sus valores más bajos en el grupo de manteca y los mayores con el de coco ($p < 0,001$). La actividad AspAPsol es menor con el grupo de girasol (también manteca pero sin diferencias significativas) que con el resto de las grasas ($p < 0,01$). La actividad pGluAPsol es menor en el grupo de girasol que en los grupos de sésamo y oliva ($p < 0,01$).

Las actividades ArgAPmb y pGluAPmb no muestran diferencias significativas entre grupos. La actividad CysAPmb es menor en el grupo de girasol que en los de manteca y coco ($p < 0,01$). La actividad GluAPmb es menor en girasol que en el grupo de sésamo ($p < 0,05$). La actividad AspAPmb alcanza sus valores más altos con el grupo de coco y los más bajos con la manteca de cerdo ($p < 0,001$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CAYADO AÓRTICO

- (Tabla 18) La actividad AlaAPsol alcanza sus valores más altos con los grupos de girasol, sésamo y pescado, estando los valores más bajos con oliva, manteca y coco ($p < 0,001$). Las actividades ArgAPsol y CysAPsol no alcanzan diferencias significativas entre grupos. Las actividades GluAP, AspAP y pGluAP solubles tienen el mismo patrón, alcanzando sus valores mayores con el pescado y los menores con el girasol ($p < 0,01$).

Las actividades AlaAPmb y ArgAPmb son mayores en los grupos de oliva y coco ($p < 0,01$ y $p < 0,001$). La actividad GluAPmb es menor en girasol que en el grupo de oliva ($p < 0,01$). La actividad AspAPmb es menor en el grupo de manteca que en el de pescado ($p < 0,05$). La actividad pGluAPmb alcanza sus valores más altos en el grupo de pescado y los más bajos en el de girasol ($p < 0,001$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN VENTRÍCULO

- (Tabla 19) La actividad AlaAPsol es mayor en el grupo de girasol que en el de pescado ($p < 0,05$). La actividad ArgAPsol es mayor con el grupo de manteca que

con el de pescado ($p < 0,05$). La actividad CysAPsol aumenta con el girasol si lo comparamos con el resto de las grasas ($p < 0,001$). La actividad GluAPsol alcanza sus valores más altos con los grupos de girasol y manteca ($p < 0,001$). La actividad AspAPsol es mayor en el grupo de girasol ($p < 0,001$). La actividad pGluAPsol alcanza sus valores más altos con el grupo de girasol y los más bajos con el de oliva ($p < 0,001$).

Con las actividades AlaAP y ArgAP unidas a membrana también se alcanzan los valores mayores con el grupo de girasol ($p < 0,001$). Con las actividades CysAP, AspAP y pGluAP en su forma unida a membrana obtenemos un patrón parecido cuyos valores más altos de actividad se alcanzan con los grupos de girasol y manteca ($p < 0,001$). Con la actividad GluAPmb no se aprecian diferencias significativas entre grupos.

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN AURÍCULA

- (Tabla 20) La actividad AlaAPsol es menor en el grupo de coco al compararlo con el de sésamo ($p < 0,05$). La actividad ArgAPsol es menor en el grupo de girasol que en el de manteca ($p < 0,05$). La actividad CysAPsol es mayor en el grupo de pescado que en los de girasol y manteca ($p < 0,01$). La actividad GluAPsol es mayor con el pescado ($p < 0,05$). No se aprecia actividad en los grupos de girasol y manteca. Tampoco se aprecia ninguna actividad AspAPsol en ninguno de los grupos experimentales. La actividad pGluAPsol es mayor en el grupo de pescado ($p < 0,05$), no se aprecia dicha actividad en el grupo de manteca.

En la actividad AlaAPmb sólo se aprecia un pequeño aumento en el grupo de manteca al compararlo con el de pescado. La actividad ArgAPmb es mayor en el grupo de coco que en los de sésamo, girasol y pescado ($p < 0,001$). No se aprecian actividades CysAPmb ni pGluAPmb. Las actividades GluAPmb y AspAPmb presentan parecidos patrones estando los valores más altos en el grupo de oliva ($p < 0,001$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN TESTÍCULO

- (Tabla 21) Las actividades AlaAP, ArgAP y CysAP solubles tienen el mismo patrón alcanzando sus valores más altos con la manteca manteniendo diferencias significativas frente a todos los aceites exceptuando al de girasol ($p < 0,001$). La actividad GluAPsol obtiene sus valores más altos con manteca y coco y los más bajos con el aceite de oliva ($p < 0,001$). Las actividades AspAPsol y pGluAPsol son mayores con el aceite de girasol y la manteca y menores con los grupos de oliva y coco ($p < 0,001$).

Con las actividades AlaAP, ArgAP y CysAP unidas a membrana se alcanzan los valores más altos en el grupo de manteca frente a los valores más bajos obtenidos por el grupo de pescado ($p < 0,01$; $p < 0,001$). Con la actividad GluAPmb no se alcanzan diferencias significativas. La actividad AspAPmb es mayor en los grupos de manteca y coco frente a los de sésamo y oliva ($p < 0,05$). La actividad pGluAPmb es mayor en los grupos de girasol, manteca y coco frente a sésamo, pescado y oliva ($p < 0,001$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CORTEZA FRONTAL

- (Tabla 22) Las actividades AlaAPsol, ArgAPsol y GluAPsol no presentan diferencias significativas entre grupos. La actividad CysAPsol es menor con las grasas más saturadas, manteca y coco ($p < 0,001$). La actividad AspAPsol es menor en el grupo de girasol si lo comparamos con el de sésamo ($p < 0,01$). La actividad pGluAPsol es menor en los grupos de girasol y manteca ($p < 0,001$).

La actividad AlaAPmb es mayor en los grupos de manteca y oliva ($p < 0,001$). La actividad ArgAPmb es mayor en los grupos de manteca y coco frente a los de girasol y pescado ($p < 0,001$). La actividad CysAPmb es menor en el grupo de girasol frente a los de sésamo, oliva y coco ($p < 0,001$). La actividad GluAPmb no presenta diferencias significativas entre grupos. La actividad AspAPmb alcanza sus niveles más bajos en los grupos de girasol y manteca ($p < 0,001$). La actividad pGluAPmb es menor en el grupo de girasol si lo comparamos con el de sésamo ($p < 0,05$).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN HIPOTÁLAMO

- (Tabla 23) Las actividades ArgAP y AspAP solubles no presentan diferencias significativas entre grupos. La actividad AlaAPsol es menor en el grupo de coco al compararlo con el de girasol ($p < 0,05$). La actividad CysAPsol es menor en el grupo de coco frente al de sésamo ($p < 0,05$). La actividad GluAPsol es menor en girasol, manteca y coco frente a los demás grupos ($p < 0,001$). La actividad pGluAPsol es menor en los grupos de oliva y manteca frente a los de sésamo y pescado ($p < 0,001$).

La actividad AlaAPmb es menor en el grupo de sésamo, girasol y pescado al compararlo con el de coco ($p < 0,001$). La actividad ArgAPmb es menor en pescado que en coco ($p < 0,05$). La actividad CysAPmb es también menor en el grupo de pescado frente a los grupos de oliva y manteca ($p < 0,01$). La actividad GluAPmb es menor en girasol, pescado y manteca si los comparamos con los valores del grupo de sésamo ($p < 0,01$). La actividad pGluAPmb presenta sus menores valores con el grupo de oliva ($p < 0,05$).

7.TABLAS

PESOS SEMANALES

semana	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
1 ^a	124 ± 13	128 ± 9	128 ± 12	124 ± 12	133 ± 11	131 ± 11	0,9903
2 ^a	156 ± 13	160 ± 8	158 ± 11	162 ± 11	175 ± 10	161 ± 11	0,8482
3 ^a	204 ± 13	208 ± 7	205 ± 9	207 ± 11	213 ± 10	207 ± 10	0,9911
4 ^a	250 ± 12	246 ± 8	243 ± 8	250 ± 9	250 ± 12	251 ± 10	0,9936
5 ^a	283 ± 12	276 ± 9	275 ± 10	280 ± 8	277 ± 15	274 ± 10	0,9938
6 ^a	312 ± 12	295 ± 12	298 ± 13	311 ± 7	298 ± 17	299 ± 14	0,9098
7 ^a	337 ± 13	323 ± 15	316 ± 15	330 ± 7	315 ± 19	325 ± 12	0,8938
8 ^a	358 ± 14	339 ± 16	328 ± 18	351 ± 5	331 ± 20	345 ± 11	0,7125
9 ^a	371 ± 14	358 ± 17	352 ± 19	369 ± 5	346 ± 21	366 ± 11	0,8533
10 ^a	393 ± 15	370 ± 19	372 ± 21	395 ± 6	359 ± 22	400 ± 17	0,5132
11 ^a	402 ± 14	380 ± 19	382 ± 22	404 ± 8	364 ± 22	409 ± 13	0,4365
12 ^a	421 ± 16	398 ± 20	396 ± 24	419 ± 8	379 ± 23	415 ± 9	0,5556
13 ^a	431 ± 16	412 ± 21	404 ± 27	434 ± 9	391 ± 25	422 ± 13	0,6238
14 ^a	428 ± 17	418 ± 21	412 ± 26	439 ± 9	398 ± 25	433 ± 13	0,7103
15 ^a	437 ± 18	429 ± 22	423 ± 26	446 ± 10	407 ± 25	443 ± 11	0,7524
16 ^a	435 ± 15	432 ± 21	431 ± 27	450 ± 10	413 ± 25	449 ± 11	0,7780

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
Peso final (g)	436 ± 17	415 ± 4	430 ± 1,5	449 ± 12	413 ± 22	439 ± 2,5	0,4004
Ganancia de peso (g)	312 ± 24	287 ± 1,5	302 ± 13	324 ± 14	280 ± 21	308 ± 0	0,4290
Peso corazón (g/100g)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,1596
Peso hígado (g/100g)	3,3 ± 0,1	2,5 ± 0,02	2,9 ± 0,01	2,9 ± 0,1	3 ± 0,03	2,7 ± 0,02	0,0045
Peso riñón (g/100g)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,4977
Peso cerebro (g/100g)	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,3375

TABLAS 6 y 7. Pesos semanales, ganancia de peso y peso tras el sacrificio expresados en gramos. Pesos del corazón, hígado, riñón y cerebro expresados en gramos por 100 gramos de peso corporal. "p" indica las diferencias significativas entre grupos.

INGESTA DE ALIMENTO

semana	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
1 ^a	11,8 ± 1,3	11,7 ± 1,3	11,2 ± 1,3	11,1 ± 0,4	13,9 ± 0,05	12,3 ± 1,8	0,6191
2 ^a	15,8 ± 1,9	16,3 ± 1,2	15,8 ± 1,3	15,7 ± 1,9	16 ± 0,6	15,6 ± 1,1	0,9991
3 ^a	16,1 ± 1,1	15,8 ± 0,3	15,7 ± 1,2	16,2 ± 0,6	16,1 ± 0,5	16,1 ± 0,9	0,9953
4 ^a	22,5 ± 1	19,6 ± 0,3	18,2 ± 0,1	19,6 ± 1,2	18,9 ± 0,4	18,8 ± 0,1	0,0410
5 ^a	18,2 ± 1	17,2 ± 1,5	16,4 ± 0,3	18,1 ± 0,7	17 ± 0,8	16,9 ± 1,7	0,8483
6 ^a	22,5 ± 0,8	21,5 ± 0,7	19,3 ± 0,2	20,8 ± 1,8	18,8 ± 0,1	19,5 ± 1,1	0,1966
7 ^a	19,6 ± 0,1	19,4 ± 0,8	16,8 ± 1,4	18,7 ± 0,9	17,7 ± 0,3	19,9 ± 0,4	0,1971
8 ^a	19,7 ± 0,1	18 ± 1,1	17,2 ± 0,6	17,5 ± 1,9	17,1 ± 0,3	18,9 ± 1,2	0,5218
9 ^a	18,6 ± 0,3	20,8 ± 1,4	20 ± 2,4	21,1 ± 1,7	16,9 ± 0,4	21,7 ± 0,8	0,2166
10 ^a	19,2 ± 0,3	17,7 ± 0,5	17,2 ± 0,6	21 ± 2	19 ± 1,1	20,2 ± 1,5	0,3021
11 ^a	20 ± 0,2	20,2 ± 1,1	19 ± 0,3	20 ± 0,7	18 ± 1,1	20,5 ± 0,2	0,2797
12 ^a	18,5 ± 0,2	18,7 ± 0,3	17,5 ± 0,2	18,2 ± 2,2	18 ± 0,6	19,2 ± 0,8	0,8694
13 ^a	16,7 ± 3,1	19,2 ± 0,1	18 ± 0,2	19,2 ± 0,1	17,7 ± 1,6	18,7 ± 1,3	0,8283
14 ^a	17,2 ± 1,8	19,5 ± 0,6	18,7 ± 0,1	19,2 ± 0	18 ± 0,7	21,5 ± 0,5	0,1422
15 ^a	14,6 ± 0,4	17,7 ± 0,2	17,5 ± 0,7	16 ± 0,2	17 ± 0,7	16,8 ± 0,8	0,0717
16 ^a	19,1 ± 0,4	18,1 ± 0,4	19,6 ± 0,1	20,5 ± 0,5	18 ± 1	23,1 ± 0,1	0,0030
\bar{X}	18,1 ± 0,7	18,2 ± 0,6	17,4 ± 0,5	18,3 ± 0,6	17,3 ± 0,3	18,7 ± 0,7	0,5216

TABLA 8. Gramos de alimento consumidos por día durante las 16 semanas en las que se administraron las dietas experimentales. "p" indica las diferencias significativas entre grupos.

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
Eficiencia del alimento (g/g)	15 ± 1,4	14 ± 0,2	15 ± 0,7	16 ± 0,1	14 ± 1,4	15 ± 0,1	0,7921
Ingesta Energética (KJ/día)	311 ± 5,8	312 ± 3,4	298 ± 1,2	314 ± 8,4	297 ± 6,6	321 ± 0,4	0,0905

TABLA 9. Eficiencia en el uso del alimento e Ingesta energética expresados en g/g y KJ/día respectivamente. "p" indica las diferencias significativas entre grupos.

INGESTA DE AGUA

semana	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
1 ^a	15,9 ± 1,6	15,8 ± 0,9	14,6 ± 1,4	14,1 ± 1,6	18,6 ± 0,1	16,9 ± 0,5	0,2370
2 ^a	32 ± 5,8	29,7 ± 4,1	27,1 ± 5,3	27,8 ± 4,1	25,2 ± 0,8	33,7 ± 6,3	0,8056
3 ^a	29,3 ± 1,4	27,4 ± 3,1	25,5 ± 1,9	25,6 ± 3	26,5 ± 2,4	28,7 ± 2,3	0,8259
4 ^a	30,3 ± 2,5	27,6 ± 0,9	25,6 ± 1,8	25,4 ± 0,7	24 ± 2,8	27,6 ± 0,1	0,2982
5 ^a	35,2 ± 4,7	34 ± 0,2	32,4 ± 0,3	33,3 ± 1,1	29 ± 3,1	33,1 ± 2,2	0,6455
6 ^a	32,3 ± 4,7	30,8 ± 0,1	29 ± 1,3	29,3 ± 1,3	27,3 ± 5,1	29 ± 0,9	0,8764
7 ^a	33 ± 5	32,5 ± 0,2	30,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	26,6 ± 2,8	32,1 ± 0,6	0,4296
8 ^a	34,2 ± 3,5	33,1 ± 1,4	25,7 ± 0,7	29,1 ± 1,3	25,6 ± 2,6	30 ± 2,2	0,1299
9 ^a	41,1 ± 7,6	38,7 ± 0,8	30,9 ± 2,6	33,6 ± 0,9	29,4 ± 2,9	38 ± 1,5	0,2740
10 ^a	35 ± 8,1	30,7 ± 2	27 ± 1,6	27,2 ± 2,2	22,7 ± 1,5	31,2 ± 0,1	0,3346
11 ^a	35,2 ± 7,7	32 ± 2	25,2 ± 1,7	26,5 ± 0,6	24,5 ± 1,5	30,7 ± 1	0,3041
12 ^a	26,7 ± 4,1	27,5 ± 1,2	21,2 ± 0,1	20 ± 0,5	22 ± 2	26,5 ± 2,5	0,1808
13 ^a	28 ± 2,5	30 ± 1,3	22,7 ± 1	25,2 ± 0,1	21,2 ± 0,6	27 ± 1,8	0,0353
14 ^a	29,2 ± 3,7	30 ± 1	24 ± 1,2	25,2 ± 0,5	21,5 ± 0,7	29,2 ± 1,6	0,0736
15 ^a	40,1 ± 9,6	40,6 ± 2,8	28,5 ± 1	32,6 ± 0,1	33 ± 2,7	34,1 ± 0,8	0,4083
16 ^a	34,2 ± 6	31,8 ± 1,3	23,7 ± 1	27,8 ± 0,4	22,2 ± 1	30,6 ± 2,1	0,1075
\bar{X}	32 ± 1,4	31 ± 1,3	26 ± 1,1	27 ± 1,2	25 ± 0,9	30 ± 1,1	0,0001

TABLA 10. Gramos de agua consumidos por día durante las 16 semanas en las que se administraron las dietas experimentales. "p" indica las diferencias significativas entre grupos.

PRESIÓN ARTERIAL (mmHg)

semana	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
1 ^a	114 ± 7	115 ± 6,7	105 ± 2,8	119 ± 3,9	107 ± 4,1	115 ± 3	0,4927
3 ^a	114 ± 5	119 ± 3,2	111 ± 4,7	124 ± 3	113 ± 4,5	122 ± 3,3	0,1664
5 ^a	138 ± 4,7	123 ± 4,6	119 ± 3,9	134 ± 3,7	128 ± 5,6	129 ± 7	0,1479
7 ^a	131 ± 5,8	131 ± 6	113 ± 3,2	131 ± 5	117 ± 3,6	135 ± 6,3	0,0170
9 ^a	136 ± 4,8	132 ± 7,2	120 ± 4,5	128 ± 3,6	114 ± 6,2	132 ± 6	0,0634
11 ^a	135 ± 3,9	122 ± 5,6	120 ± 3,4	121 ± 3,9	120 ± 3,4	132 ± 3,5	0,0303
13 ^a	138 ± 3,3	129 ± 4,1	127 ± 6,4	140 ± 6,4	132 ± 4,5	139 ± 3,1	0,2739
15 ^a	144 ± 2	142 ± 5,2	135 ± 5,6	151 ± 4,8	131 ± 6,5	146 ± 4,6	0,0753
17 ^a	140 ± 4,6	148 ± 6,9	121 ± 4,5	153 ± 4,6	121 ± 3,2	147 ± 5,2	0,0000
\bar{X}	130 ± 2,6	134 ± 3,5	121 ± 2,7	137 ± 2,7	123 ± 4,7	135 ± 3	0,0035

FRECUENCIA CARDIACA (ppm)

semana	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
1 ^a	305 ± 44	314 ± 27	317 ± 23	368 ± 29	340 ± 24	292 ± 50	0,6509
3 ^a	433 ± 8	413 ± 6	395 ± 13	385 ± 10	393 ± 8	388 ± 8	0,0072
5 ^a	433 ± 10	438 ± 14	426 ± 12	397 ± 5	440 ± 5	416 ± 9	0,0365
7 ^a	435 ± 8	448 ± 12	380 ± 33	440 ± 13	390 ± 37	418 ± 26	0,3398
9 ^a	423 ± 28	460 ± 10	438 ± 23	425 ± 16	472 ± 10	458 ± 10	0,2604
11 ^a	436 ± 13	433 ± 12	431 ± 8	408 ± 8	448 ± 11	434 ± 5	0,1421
13 ^a	451 ± 13	455 ± 11	451 ± 5	420 ± 14	468 ± 12	444 ± 11	0,1196
15 ^a	432 ± 14	441 ± 13	436 ± 9	417 ± 11	442 ± 9	453 ± 9	0,3263
17 ^a	439 ± 13	454 ± 14	443 ± 10	422 ± 13	426 ± 21	444 ± 14	0,6889
\bar{X}	433 ± 10	445 ± 10	425 ± 8	416 ± 6	437 ± 8	434 ± 7	0,2333

TABLAS 11 y 12. Niveles de presión arterial y frecuencia cardiaca expresados en mmHg y ppm respectivamente. "p" indica las diferencias significativas entre grupos.

DETERMINACIONES PLASMÁTICAS

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
CHO-T (mg/dL)	172 ± 11	153 ± 9	119 ± 7	173 ± 14	111 ± 7	187 ± 10	0,0000
CHO-HDL(mg/dL)	23,2 ± 3,6	15,7 ± 4,9	22,8 ± 2,9	35,6 ± 6,8	39,9 ± 3,1	38 ± 7,5	0,0055
CHO-LDL(mg/dL)	115 ± 14	133 ± 9	88 ± 8	105 ± 11	48 ± 6	133 ± 12	0,0000
TGL(mg/dL)	166 ± 31	24 ± 7	41 ± 9	163 ± 40	115 ± 20	79 ± 11	0,0002
HDL/CHO-T(%)	14 ± 3	10 ± 2	20 ± 4	20 ± 4	37 ± 4	20 ± 4	0,0001
LDL/CHO-T(%)	65 ± 4	89 ± 2	72 ± 3	60 ± 4	42 ± 3	70 ± 4	0,0000
T (ng/ml)	3,1 ± 1	3,5 ± 1,3	2,4 ± 0,9	1,8 ± 0,4	8,2 ± 1,4	4,1 ± 1	0,0026
DHT (pg/ml)	653 ± 131	516 ± 146	382 ± 78	505 ± 148	892 ± 117	737 ± 150	0,0985
E (pg/ml)	29 ± 4,9	29 ± 1,3	37 ± 3,5	29 ± 3,3	31 ± 2,1	42 ± 1,4	0,0167

TABLA 13. Niveles de Colesterol-Total, Colesterol-HDL, Colesterol-LDL y Triglicéridos expresados en mg/dL. También se indica el porcentaje de Colesterol-HDL y Colesterol-LDL frente al contenido total de Colesterol. Los Niveles de Testosterona, Dihidrotestosterona y Estradiol están expresados en ng ó pg/ml. "p" indica las diferencias significativas entre grupos.

PROTEÍNAS EN PLASMA

Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
141,5 ± 0,4	139,3 ± 0,9	141,9 ± 0,3	141,4 ± 0,3	140,8 ± 0,3	141,9 ± 2,3	0,0034

TABLA 14. Valores de proteínas en plasma expresados como μg de proteína/10ml. También se indica la existencia de diferencias significativas entre grupos (p).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN PLASMA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p
AlaAP	167 ± 26	175 ± 21	86 ± 23	127 ± 17	188 ± 27	99 ± 12	0,0095
ArgAP	150 ± 17	205 ± 23	86 ± 18	133 ± 14	209 ± 25	103 ± 11	0,0001
CysAP	92 ± 7	50 ± 6	73 ± 15	83 ± 7	106 ± 6	85 ± 5	0,0018
GluAP	25 ± 2,8	8,8 ± 1,5	15 ± 2,8	24 ± 4,5	32 ± 2,3	27 ± 3,7	0,0002
AspAP	31 ± 1,5	14 ± 1,9	21 ± 2,7	34 ± 4,4	41 ± 4,1	33 ± 2,8	0,0000
pGluAP	30 ± 2	11 ± 1,9	20 ± 2,5	33 ± 4,7	39 ± 3,1	32 ± 2,9	0,0000

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CORTEZA RENAL

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	4937 ± 174	5039 ± 496	3922 ± 527	4402 ± 260	5103 ± 327	4401 ± 347	0,1854
	ArgAP	4323 ± 431	4654 ± 524	4354 ± 468	4068 ± 196	4924 ± 335	4059 ± 341	0,5883
	CysAP	8188 ± 301	7650 ± 838	7241 ± 635	7284 ± 463	7714 ± 709	7146 ± 416	0,7210
	GluAP	452 ± 46	452 ± 43	439 ± 39	495 ± 44	509 ± 57	502 ± 39	0,8135
	AspAP	120 ± 12	132 ± 19	116 ± 13	143 ± 18	68 ± 8	112 ± 16	0,0323
	pGluAP	1864 ± 79	2029 ± 172	1664 ± 175	1833 ± 213	1858 ± 213	1405 ± 120	0,1419
Unida a membrana	AlaAP	7611 ± 544	8643 ± 941	7694 ± 637	6194 ± 640	8056 ± 867	7439 ± 758	0,3334
	ArgAP	6549 ± 466	7626 ± 494	7104 ± 588	6615 ± 678	7129 ± 778	7034 ± 678	0,8898
	CysAP	10096 ± 779	9353 ± 797	8690 ± 723	8323 ± 752	10628 ± 1031	8602 ± 812	0,2919
	GluAP	1050 ± 176	986 ± 164	886 ± 101	923 ± 99	938 ± 81	832 ± 82	0,8396
	AspAP	305 ± 37	478 ± 52	575 ± 75	506 ± 46	369 ± 82	452 ± 66	0,0500
	pGluAP	261 ± 126	767 ± 164	485 ± 153	545 ± 175	200 ± 85	284 ± 74	0,2090

TABLAS 15 y 16. Valores medios \pm el error estándar de la actividad de aminopeptidasas en plasma y aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en corteza renal, expresados como pmoles de Ala- β -NA, Arg- β -NA, Cys- β -NA, Glu- β -NA, Asp- β -NA y pGlu- β -NA hidrolizados/min/mg prot respectivamente. Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas entre grupos (p).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN MEDULA RENAL

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	7520 ± 583	8640 ± 659	8288 ± 640	7078 ± 661	9709 ± 1055	7040 ± 667	0,0931
	ArgAP	6370 ± 574	7883 ± 865	7430 ± 672	6880 ± 498	9631 ± 998	6683 ± 682	0,0345
	CysAP	6808 ± 533	8738 ± 907	7587 ± 788	7943 ± 555	7487 ± 858	9052 ± 629	0,2655
	GluAP	181 ± 29	234 ± 25	215 ± 17	289 ± 36	66 ± 16	359 ± 35	0,0000
	AspAP	29 ± 11	144 ± 27	150 ± 17	154 ± 22	32 ± 14	162 ± 20	0,0024
	pGluAP	352 ± 32	613 ± 42	512 ± 60	549 ± 31	476 ± 43	515 ± 32	0,0035
Unida a membrana	AlaAP	8906 ± 662	14041 ± 1799	10472 ± 668	10537 ± 724	11860 ± 1169	9761 ± 706	0,0205
	ArgAP	10874 ± 607	15289 ± 1669	12791 ± 813	10641 ± 987	12946 ± 1491	11246 ± 781	0,0501
	CysAP	9288 ± 404	11660 ± 803	10957 ± 641	11957 ± 837	12663 ± 573	12261 ± 475	0,0089
	GluAP	936 ± 56	1663 ± 258	1343 ± 120	1120 ± 81	1179 ± 114	1481 ± 234	0,0394
	AspAP	180 ± 16	353 ± 54	281 ± 29	343 ± 30	137 ± 20	367 ± 42	0,0001
	pGluAP	-	254 ± 70	151 ± 16	159 ± 24	-	135 ± 17	0,1287

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN AORTA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	5115 ± 589	6607 ± 485	5665 ± 763	1228 ± 263	1179 ± 212	892 ± 81	0,0000
	ArgAP	8418 ± 644	8977 ± 555	9885 ± 923	7755 ± 877	8564 ± 391	7224 ± 511	0,1248
	CysAP	-	-	-	-	-	-	-
	GluAP	352 ± 66	778 ± 142	1347 ± 251	1105 ± 144	730 ± 147	948 ± 115	0,0013
	AspAP	340 ± 56	690 ± 124	1124 ± 206	864 ± 132	478 ± 48	838 ± 235	0,0061
	pGluAP	373 ± 46	902 ± 192	1122 ± 194	793 ± 124	484 ± 78	544 ± 136	0,0028
Unida a membrana	AlaAP	2612 ± 389	2683 ± 398	3227 ± 491	12244 ± 997	5286 ± 592	12794 ± 1526	0,0000
	ArgAP	4555 ± 706	9020 ± 1248	3588 ± 384	15391 ± 1515	7078 ± 733	11876 ± 910	0,0000
	CysAP	-	-	-	-	-	-	-
	GluAP	3761 ± 377	5024 ± 913	6925 ± 927	6968 ± 722	3996 ± 500	6514 ± 1074	0,0076
	AspAP	4618 ± 744	4830 ± 681	7719 ± 1129	6637 ± 719	4155 ± 463	6710 ± 1148	0,0237
	pGluAP	2298 ± 318	3732 ± 782	6657 ± 989	5716 ± 760	3581 ± 510	5788 ± 820	0,0007

TABLAS 17 y 18. Valores medios ± el error estándar de la actividad de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en médula renal y aorta, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Arg-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA, Asp-β-NA y pGlu-β-NA hidrolizados/min/mg prot respectivamente. Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas entre grupos (p).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN VENTRÍCULO

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	10494 ± 667	8819 ± 1131	6902 ± 402	7991 ± 624	8850 ± 672	7750 ± 532	0,0138
	ArgAP	10728 ± 682	9018 ± 1120	8202 ± 404	9699 ± 865	11444 ± 865	8588 ± 442	0,0250
	CysAP	11513 ± 444	7916 ± 283	7105 ± 309	6389 ± 849	6738 ± 1077	6203 ± 712	0,0000
	GluAP	347 ± 32	193 ± 33	125 ± 24	90 ± 307	307 ± 28	73 ± 19	0,0000
	AspAP	446 ± 40	216 ± 63	166 ± 41	130 ± 32	283 ± 35	115 ± 26	0,0000
	pGluAP	804 ± 28	440 ± 60	502 ± 46	324 ± 26	541 ± 69	368 ± 51	0,0000
Unida a membrana	AlaAP	9482 ± 631	6364 ± 207	6709 ± 348	6794 ± 277	8168 ± 239	8253 ± 348	0,0000
	ArgAP	11564 ± 582	9939 ± 333	9118 ± 433	9205 ± 184	10221 ± 243	10427 ± 416	0,0006
	CysAP	3796 ± 242	1691 ± 207	1532 ± 184	1364 ± 148	2980 ± 183	1475 ± 154	0,0000
	GluAP	767 ± 115	405 ± 92	389 ± 35	494 ± 103	574 ± 113	422 ± 117	0,0850
	AspAP	466 ± 66	193 ± 24	149 ± 24	112 ± 12	293 ± 39	119 ± 5	0,0000
	pGluAP	359 ± 45	99 ± 29	74 ± 17	60 ± 16	204 ± 28	89 ± 16	0,0000

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN AURÍCULA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	8022 ± 927	11274 ± 1941	9840 ± 1024	7692 ± 474	10721 ± 902	7114 ± 694	0,0345
	ArgAP	5319 ± 644	7651 ± 1313	7721 ± 468	5938 ± 407	8715 ± 1131	5606 ± 895	0,0354
	CysAP	288 ± 61	555 ± 140	873 ± 122	471 ± 58	361 ± 84	465 ± 115	0,0050
	GluAP	-	61 ± 28	115 ± 18	52 ± 9	-	43 ± 20	0,0342
	AspAP	-	-	-	-	-	-	-
	pGluAP	12 ± 2	41 ± 8	57 ± 12	51 ± 10	-	29 ± 7	0,0351
Unida a membrana	AlaAP	5456 ± 355	5093 ± 336	4699 ± 197	5656 ± 265	6013 ± 296	5574 ± 186	0,0330
	ArgAP	5666 ± 238	5718 ± 327	5020 ± 317	6229 ± 289	6250 ± 344	7208 ± 408	0,0009
	CysAP	-	-	-	-	-	-	-
	GluAP	140 ± 28	181 ± 26	199 ± 59	364 ± 54	106 ± 25	128 ± 38	0,0008
	AspAP	248 ± 22	279 ± 36	340 ± 40	477 ± 31	362 ± 31	337 ± 38	0,0006
	pGluAP	-	-	-	-	-	-	-

TABLAS 19 y 20. Valores medios ± el error estándar de la actividad de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en ventrículo y aurícula, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Arg-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA, Asp-β-NA y pGlu-β-NA hidrolizados/min/mg prot respectivamente. Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas entre grupos (p).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN TESTICULO

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	3493 ± 362	2762 ± 183	2759 ± 194	2876 ± 216	4085 ± 327	2908 ± 134	0,0010
	ArgAP	5475 ± 354	4435 ± 270	4266 ± 262	4834 ± 445	6990 ± 511	4824 ± 246	0,0000
	CysAP	4963 ± 168	4292 ± 171	4341 ± 217	4319 ± 213	5733 ± 145	4660 ± 247	0,0000
	GluAP	109 ± 7	91 ± 11	98 ± 10	79 ± 7	127 ± 6	137 ± 11	0,0004
	AspAP	145 ± 7	118 ± 9	115 ± 6	91 ± 7	126 ± 7	103 ± 6	0,0001
	pGluAP	174 ± 7	140 ± 9	139 ± 8	125 ± 4	173 ± 5	130 ± 9	0,0000
Unida a membrana	AlaAP	4951 ± 322	4148 ± 248	3597 ± 250	4673 ± 591	6348 ± 962	4050 ± 204	0,0094
	ArgAP	8576 ± 509	6720 ± 486	5949 ± 369	7638 ± 815	9686 ± 992	6586 ± 207	0,0066
	CysAP	1590 ± 189	1597 ± 223	1381 ± 258	2497 ± 235	2879 ± 364	1982 ± 215	0,0007
	GluAP	276 ± 6	250 ± 18	227 ± 14	235 ± 14	305 ± 50	289 ± 7	0,1605
	AspAP	79 ± 5	62 ± 7	64 ± 3	61 ± 7	85 ± 10	85 ± 7	0,0229
	pGluAP	27 ± 1,2	20 ± 0,8	20 ± 0,7	20 ± 0,7	30 ± 1,3	26 ± 1,6	0,0000

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN CORTEZA FRONTAL

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	AlaAP	20396± 1239	21653± 2930	23573± 2682	21482± 1048	21157± 2492	16878± 573	0.3015
	ArgAP	18772± 1530	21092± 2763	21114± 2480	19549± 1615	20574± 2795	18805± 723	0.9284
	CysAP	13735± 1164	13784 ± 561	10788± 1548	10397± 1046	6765 ± 856	8919 ± 773	0.0001
	GluAP	554 ± 78	546 ± 82	445 ± 46	456 ± 72	426 ± 103	370 ± 50	0.4853
	AspAP	277 ± 34	678 ± 108	542 ± 89	455 ± 57	367 ± 75	366 ± 66	0.0092
	pGluAP	245 ± 37	584 ± 104	537 ± 44	446 ± 51	241 ± 62	326 ± 30	0.0002
Unida a membrana	AlaAP	10240 ± 505	10127 ± 397	9109 ± 467	12355± 446	13070 ± 358	11305± 1155	0.0000
	ArgAP	11823± 523	12916± 1045	11178± 534	13483± 592	14857 ± 605	15533± 328	0.0003
	CysAP	1954 ± 63	3173 ± 248	2723 ± 175	3254 ± 314	2599 ± 122	2965 ± 168	0.0005
	GluAP	205 ± 20	316 ± 22	248 ± 41	297 ± 56	224 ± 28	309 ± 76	0.2548
	AspAP	134 ± 34	484 ± 76	295 ± 57	369 ± 49	157 ± 31	323 ± 67	0.0003
	pGluAP	57 ± 17	244 ± 51	234 ± 17	205 ± 35	96 ± 23	229 ± 26	0.0177

TABLAS 21 y 22. Valores medios ± el error estándar de la actividad de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en testículo y corteza frontal, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Arg-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA, Asp-β-NA y pGlu-β-NA hidrolizados/min/mg prot respectivamente. Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas entre grupos (p).

ACTIVIDAD AMINOPEPTIDASA EN HIPOTALAMO

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	P	
Soluble	AlaAP	35756± 3334	30482± 4189	25652± 1666	26814± 2919	28230± 1831	21901± 2242	0.0240
	ArgAP	36916± 3247	36180± 5756	31488± 2476	32926± 3805	34463± 2496	29697± 3895	0.7221
	CysAP	11512 ± 993	13966± 1946	10327 ± 891	11159± 1785	8683 ± 572	7732 ± 894	0.0210
	GluAP	1888 ± 250	4253 ± 741	3630 ± 500	3160 ± 487	1081 ± 247	1061 ± 142	0.0000
	AspAP	3494 ± 478	4606 ± 819	4737 ± 377	4603 ± 264	2769 ± 323	4652 ± 778	0.0580
	pGluAP	2770 ± 234	4265 ± 633	3554 ± 461	1522 ± 121	1648 ± 236	2912 ± 412	0.0000
Unida a membrana	AlaAP	8648 ± 699	8597 ± 1092	8320 ± 745	11535 ± 863	11746 ± 565	13821± 1240	0.0002
	ArgAP	11414± 1056	13745± 2228	10330 ± 843	14362± 1578	15653± 1110	16898± 1431	0.0221
	CysAP	2807 ± 405	4593 ± 975	2271 ± 244	5482 ± 670	5038 ± 541	4924 ± 808	0.0043
	GluAP	1539 ± 113	3739 ± 726	1423 ± 104	2891 ± 455	1905 ± 194	2891 ± 544	0.0019
	AspAP	2524 ± 423	3149 ± 493	2559 ± 347	2818 ± 349	2349 ± 467	2825 ± 419	0.8048
	pGluAP	2017 ± 312	2237 ± 542	1387 ± 178	761 ± 117	1598 ± 313	2373 ± 343	0.0123

TABLA 23. Valores medios ± el error estándar de la actividad de aminopeptidasas solubles y unidas a membrana en hipotálamo, expresados como pmoles de Ala-β-NA, Arg-β-NA, Cys-β-NA, Glu-β-NA, Asp-β-NA y pGlu-β-NA hidrolizados/min/mg prot respectivamente. Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas entre grupos (p).

ACTIVIDAD ALANINA AMINOPEPTIDASA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	PI	167 ± 26	175 ± 21	86 ± 23	127 ± 17	188 ± 27	99 ± 12	0,0095
	CR	4937 ± 174	5039 ± 496	3922 ± 527	4402 ± 260	5103 ± 327	4401 ± 347	0,1854
	MR	7520 ± 583	8640 ± 659	8288 ± 640	7078 ± 661	9709 ± 1055	7040 ± 667	0,0931
	A	5115 ± 589	6607 ± 485	5665 ± 763	1228 ± 263	1179 ± 212	892 ± 81	0,0000
	V	10494 ± 667	8819 ± 1131	6902 ± 402	7991 ± 624	8850 ± 672	7750 ± 532	0,0138
	Au	8022 ± 927	11274 ± 1941	9840 ± 1024	7692 ± 474	10721 ± 902	7114 ± 694	0,0345
	T	3493 ± 362	2762 ± 183	2759 ± 194	2876 ± 216	4085 ± 327	2908 ± 134	0,0010
	CF	20396 ± 1239	21653 ± 2930	23573 ± 2682	21482 ± 1048	21157 ± 2492	16878 ± 573	0.3015
	HT	35756 ± 3334	30482 ± 4189	25652 ± 1666	26814 ± 2919	28230 ± 1831	21901 ± 2242	0.0240
Unida a membrana	CR	7611 ± 544	8643 ± 941	7694 ± 637	6194 ± 640	8056 ± 867	7439 ± 758	0,3334
	MR	8906 ± 662	14041 ± 1799	10472 ± 668	10537 ± 724	11860 ± 1169	9761 ± 706	0,0205
	A	2612 ± 389	2683 ± 398	3227 ± 491	12244 ± 997	5286 ± 592	12794 ± 1526	0,0000
	V	9482 ± 631	6364 ± 207	6709 ± 348	6794 ± 277	8168 ± 239	8253 ± 348	0,0000
	Au	5456 ± 355	5093 ± 336	4699 ± 197	5656 ± 265	6013 ± 296	5574 ± 186	0,0330
	T	4951 ± 322	4148 ± 248	3597 ± 250	4673 ± 591	6348 ± 962	4050 ± 204	0,0094
	CF	10240 ± 505	10127 ± 397	9109 ± 467	12355 ± 446	13070 ± 358	11305 ± 1155	0.0000
	HT	8648 ± 699	8597 ± 1092	8320 ± 745	11535 ± 863	11746 ± 565	13821 ± 1240	0.0002

TABLA 24. Valores medios ± el error estándar de la actividad Alanina Aminopeptidasa soluble y unida a membrana (expresados como pmoles de Ala-β-NA hidrolizados/min/mg prot) en los distintos tejidos analizados (PI: Plasma, CR: Corteza Renal, MR: Médula Renal, A: Aorta, V: Ventrículo, Au: Aurícula, T: Testículo, CF: Corteza Frontal, HT: Hipotálamo). Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas (p) entre grupos.

ACTIVIDAD ARGININA AMINOPEPTIDASA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	PI	150 ± 17	205 ± 23	86 ± 18	133 ± 14	209 ± 25	103 ± 11	0,0001
	CR	4323 ± 431	4654 ± 524	4354 ± 468	4068 ± 196	4924 ± 335	4059 ± 341	0,5883
	MR	6370 ± 574	7883 ± 865	7430 ± 672	6880 ± 498	9631 ± 998	6683 ± 682	0,0345
	A	8418 ± 644	8977 ± 555	9885 ± 923	7755 ± 877	8564 ± 391	7224 ± 511	0,1248
	V	10728 ± 682	9018 ± 1120	8202 ± 404	9699 ± 865	11444 ± 865	8588 ± 442	0,0250
	Au	5319 ± 644	7651 ± 1313	7721 ± 468	5938 ± 407	8715 ± 1131	5606 ± 895	0,0354
	T	5475 ± 354	4435 ± 270	4266 ± 262	4834 ± 445	6990 ± 511	4824 ± 246	0,0000
	CF	18772± 1530	21092± 2763	21114± 2480	19549± 1615	20574± 2795	18805± 723	0.9284
	HT	36916± 3247	36180± 5756	31488± 2476	32926± 3805	34463± 2496	29697± 3895	0.7221
Unida a membrana	CR	6549 ± 466	7626 ± 494	7104 ± 588	6615 ± 678	7129 ± 778	7034 ± 678	0,8898
	MR	10874 ± 607	15289 ± 1669	12791 ± 813	10641 ± 987	12946 ± 1491	11246 ± 781	0,0501
	A	4555 ± 706	9020 ± 1248	3588 ± 384	15391±1515	7078 ± 733	11876 ± 910	0,0000
	V	11564 ± 582	9939 ± 333	9118 ± 433	9205 ± 184	10221 ± 243	10427 ± 416	0,0006
	Au	5666 ± 238	5718 ± 327	5020 ± 317	6229 ± 289	6250 ± 344	7208 ± 408	0,0009
	T	8576 ± 509	6720 ± 486	5949 ± 369	7638 ± 815	9686 ± 992	6586 ± 207	0,0066
	CF	11823± 523	12916± 1045	11178± 534	13483± 592	14857 ± 605	15533± 328	0.0003
	HT	11414± 1056	13745± 2228	10330 ± 843	14362± 1578	15653± 1110	16898± 1431	0.0221

TABLA 25. Valores medios ± el error estándar de la actividad Arginina Aminopeptidasa soluble y unida a membrana (expresados como pmoles de Arg-β-NA hidrolizados/min/mg prot) en los distintos tejidos analizados (PI: Plasma, CR: Corteza Renal, MR: Médula Renal, A: Aorta, V: Ventrículo, Au: Aurícula, T: Testículo, CF: Corteza Frontal, HT: Hipotálamo). Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas (p) entre grupos.

ACTIVIDAD CISTINA AMINOPEPTIDASA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	PI	92 ± 7	50 ± 6	73 ± 15	83 ± 7	106 ± 6	85 ± 5	0,0018
	CR	8188 ± 301	7650 ± 838	7241 ± 635	7284 ± 463	7714 ± 709	7146 ± 416	0,7210
	MR	6808 ± 533	8738 ± 907	7587 ± 788	7943 ± 555	7487 ± 858	9052 ± 629	0,2655
	A	-	-	-	-	-	-	-
	V	11513 ± 444	7916 ± 283	7105 ± 309	6389 ± 849	6738 ± 1077	6203 ± 712	0,0000
	Au	288 ± 61	555 ± 140	873 ± 122	471 ± 58	361 ± 84	465 ± 115	0,0050
	T	4963 ± 168	4292 ± 171	4341 ± 217	4319 ± 213	5733 ± 145	4660 ± 247	0,0000
	CF	13735 ± 1164	13784 ± 561	10788 ± 1548	10397 ± 1046	6765 ± 856	8919 ± 773	0,0001
	HT	11512 ± 993	13966 ± 1946	10327 ± 891	11159 ± 1785	8683 ± 572	7732 ± 894	0,0210
Unida a membrana	CR	10096 ± 779	9353 ± 797	8690 ± 723	8323 ± 752	10628 ± 1031	8602 ± 812	0,2919
	MR	9288 ± 404	11660 ± 803	10957 ± 641	11957 ± 837	12663 ± 573	12261 ± 475	0,0089
	A	-	-	-	-	-	-	-
	V	3796 ± 242	1691 ± 207	1532 ± 184	1364 ± 148	2980 ± 183	1475 ± 154	0,0000
	Au	-	-	-	-	-	-	-
	T	1590 ± 189	1597 ± 223	1381 ± 258	2497 ± 235	2879 ± 364	1982 ± 215	0,0007
	CF	1954 ± 63	3173 ± 248	2723 ± 175	3254 ± 314	2599 ± 122	2965 ± 168	0,0005
	HT	2807 ± 405	4593 ± 975	2271 ± 244	5482 ± 670	5038 ± 541	4924 ± 808	0,0043

TABLA 26. Valores medios ± el error estándar de la actividad Cistina Aminopeptidasa soluble y unida a membrana (expresados como pmoles de Cys-β-NA hidrolizados/min/mg prot) en los distintos tejidos analizados (PI: Plasma, CR: Corteza Renal, MR: Médula Renal, A: Aorta, V: Ventrículo, Au: Aurícula, T: Testículo, CF: Corteza Frontal, HT: Hipotálamo). Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas (p) entre grupos.

ACTIVIDAD GLUTAMATO AMINOPEPTIDASA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	PI	25 ± 2,8	8,8 ± 1,5	15 ± 2,8	24 ± 4,5	32 ± 2,3	27 ± 3,7	0,0002
	CR	452 ± 46	452 ± 43	439 ± 39	495 ± 44	509 ± 57	502 ± 39	0,8135
	MR	181 ± 29	234 ± 25	215 ± 17	289 ± 36	66 ± 16	359 ± 35	0,0000
	A	352 ± 66	778 ± 142	1347 ± 251	1105 ± 144	730 ± 147	948 ± 115	0,0013
	V	347 ± 32	193 ± 33	125 ± 24	90 ± 307	307 ± 28	73 ± 19	0,0000
	Au	-	61 ± 28	115 ± 18	52 ± 9	-	43 ± 20	0,0342
	T	109 ± 7	91 ± 11	98 ± 10	79 ± 7	127 ± 6	137 ± 11	0,0004
	CF	554 ± 78	546 ± 82	445 ± 46	456 ± 72	426 ± 103	370 ± 50	0,4853
	HT	1888 ± 250	4253 ± 741	3630 ± 500	3160 ± 487	1081 ± 247	1061 ± 142	0,0000
Unida a membrana	CR	1050 ± 176	986 ± 164	886 ± 101	923 ± 99	938 ± 81	832 ± 82	0,8396
	MR	936 ± 56	1663 ± 258	1343 ± 120	1120 ± 81	1179 ± 114	1481 ± 234	0,0394
	A	3761 ± 377	5024 ± 913	6925 ± 927	6968 ± 722	3996 ± 500	6514 ± 1074	0,0076
	V	767 ± 115	405 ± 92	389 ± 35	494 ± 103	574 ± 113	422 ± 117	0,0850
	Au	140 ± 28	181 ± 26	199 ± 59	364 ± 54	106 ± 25	128 ± 38	0,0008
	T	276 ± 6	250 ± 18	227 ± 14	235 ± 14	305 ± 50	289 ± 7	0,1605
	CF	205 ± 20	316 ± 22	248 ± 41	297 ± 56	224 ± 28	309 ± 76	0,2548
	HT	1539 ± 113	3739 ± 726	1423 ± 104	2891 ± 455	1905 ± 194	2891 ± 544	0,0019

TABLA 27. Valores medios \pm el error estándar de la actividad Glutamato Aminopeptidasa soluble y unida a membrana (expresados como pmoles de Glu- β -NA hidrolizados/min/mg prot) en los distintos tejidos analizados (PI: Plasma, CR: Corteza Renal, MR: Médula Renal, A: Aorta, V: Ventrículo, Au: Aurícula, T: Testículo, CF: Corteza Frontal, HT: Hipotálamo). Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas (p) entre grupos.

ACTIVIDAD ASPARTATO AMINOPEPTIDASA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
Soluble	PI	31 ± 1,5	14 ± 1,9	21 ± 2,7	34 ± 4,4	41 ± 4,1	33 ± 2,8	0,0000
	CR	120 ± 12	132 ± 19	116 ± 13	143 ± 18	68 ± 8	112 ± 16	0,0323
	MR	29 ± 11	144 ± 27	150 ± 17	154 ± 22	32 ± 14	162 ± 20	0,0024
	A	340 ± 56	690 ± 124	1124 ± 206	864 ± 132	478 ± 48	838 ± 235	0,0061
	V	446 ± 40	216 ± 63	166 ± 41	130 ± 32	283 ± 35	115 ± 26	0,0000
	Au	-	-	-	-	-	-	-
	T	145 ± 7	118 ± 9	115 ± 6	91 ± 7	126 ± 7	103 ± 6	0,0001
	CF	277 ± 34	678 ± 108	542 ± 89	455 ± 57	367 ± 75	366 ± 66	0,0092
	HT	3494 ± 478	4606 ± 819	4737 ± 377	4603 ± 264	2769 ± 323	4652 ± 778	0.0580
Unida a membrana	CR	305 ± 37	478 ± 52	575 ± 75	506 ± 46	369 ± 82	452 ± 66	0,0500
	MR	180 ± 16	353 ± 54	281 ± 29	343 ± 30	137 ± 20	367 ± 42	0,0001
	A	4618 ± 744	4830 ± 681	7719 ± 1129	6637 ± 719	4155 ± 463	6710 ± 1148	0,0237
	V	466 ± 66	193 ± 24	149 ± 24	112 ± 12	293 ± 39	119 ± 5	0,0000
	Au	248 ± 22	279 ± 36	340 ± 40	477 ± 31	362 ± 31	337 ± 38	0,0006
	T	79 ± 5	62 ± 7	64 ± 3	61 ± 7	85 ± 10	85 ± 7	0,0229
	CF	134 ± 34	484 ± 76	295 ± 57	369 ± 49	157 ± 31	323 ± 67	0,0003
	HT	2524 ± 423	3149 ± 493	2559 ± 347	2818 ± 349	2349 ± 467	2825 ± 419	0.8048

TABLA 28. Valores medios ± el error estándar de la actividad Aspartato Aminopeptidasa soluble y unida a membrana (expresados como pmoles de Asp-β-NA hidrolizados/min/mg prot) en los distintos tejidos analizados (PI: Plasma, CR: Corteza Renal, MR: Médula Renal, A: Aorta, V: Ventrículo, Au: Aurícula, T: Testículo, CF: Corteza Frontal, HT: Hipotálamo). Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas (p) entre grupos.

ACTIVIDAD PIROGLUTAMATO AMINOPEPTIDASA

	Girasol	Sésamo	Pescado	Oliva	Manteca	Coco	p	
PI	30 ± 2	11 ± 1,9	20 ± 2,5	33 ± 4,7	39 ± 3,1	32 ± 2,9	0,0000	
CR	1864 ± 79	2029 ± 172	1664 ± 175	1833 ± 213	1858 ± 213	1405 ± 120	0,1419	
MR	352 ± 32	613 ± 42	512 ± 60	549 ± 31	476 ± 43	515 ± 32	0,0035	
A	373 ± 46	902 ± 192	1122 ± 194	793 ± 124	484 ± 78	544 ± 136	0,0028	
V	804 ± 28	440 ± 60	502 ± 46	324 ± 26	541 ± 69	368 ± 51	0,0000	
Au	12 ± 2	41 ± 8	57 ± 12	51 ± 10	-	29 ± 7	0,0351	
T	174 ± 7	140 ± 9	139 ± 8	125 ± 4	173 ± 5	130 ± 9	0,0000	
CF	245 ± 37	584 ± 104	537 ± 44	446 ± 51	241 ± 62	326 ± 30	0,0002	
HT	2770 ± 234	4265 ± 633	3554 ± 461	1522 ± 121	1648 ± 236	2912 ± 412	0,0000	
Unida a membrana	CR	261 ± 126	767 ± 164	485 ± 153	545 ± 175	200 ± 85	284 ± 74	0,2090
	MR	-	254 ± 70	151 ± 16	159 ± 24	-	135 ± 17	0,1287
	A	2298 ± 318	3732 ± 782	6657 ± 989	5716 ± 760	3581 ± 510	5788 ± 820	0,0007
	V	359 ± 45	99 ± 29	74 ± 17	60 ± 16	204 ± 28	89 ± 16	0,0000
	Au	-	-	-	-	-	-	-
	T	27 ± 1,2	20 ± 0,8	20 ± 0,7	20 ± 0,7	30 ± 1,3	26 ± 1,6	0,0000
	CF	57 ± 17	244 ± 51	234 ± 17	205 ± 35	96 ± 23	229 ± 26	0,0177
	HT	2017 ± 312	2237 ± 542	1387 ± 178	761 ± 117	1598 ± 313	2373 ± 343	0,0123

TABLA 29. Valores medios ± el error estándar de la actividad Piroglutamato Aminopeptidasa soluble y unida a membrana (expresados como pmoles de pGlu-β-NA hidrolizados/min/mg prot) en los distintos tejidos analizados (PI: Plasma, CR: Corteza Renal, MR: Médula Renal, A: Aorta, V: Ventrículo, Au: Aurícula, T: Testículo, CF: Corteza Frontal, HT: Hipotálamo). Igualmente, se indica la existencia de diferencias significativas (p) entre grupos.

CORRELACIONES HORMONAS-LÍPIDOS PLASMÁTICOS

		CHO TOTAL	CHO-HDL	CHO-LDL	TGL	%CHO-HDL/ CHO TOTAL	%CHO-LDL/ CHO
todos	T	- 0.2997		-- 0.4164		++ 0.4030	-- 0.3928
	DhT		++ 0.4228			+ 0.3475	- 0.3639
S	E		++ 0.8751			++ 0.8402	
P	E		-- 0.8909	+ 0.7508		--- 0.9374	++ 0.8409
O	T				+ 0.7667	- 0.7389	
	DhT		+++0.9375				
	E		- 0.7657				

CORRELACIONES PRESIÓN ARTERIAL- LÍPIDOS PLASMÁTICOS

		CHO TOTAL	CHO-HDL	CHO-LDL	TGL	%CHO-HDL/ CHO TOTAL	%CHO-LDL/ CHO
G	P.A.	+++0,4939		++0,4510			

CORRELACIONES PRESIÓN ARTERIAL-AMINOPEPTIDASAS PLASMÁTICAS

		AlaAPsol	ArgAPsol	CysAPsol	GluAPsol	AspAPsol	pGluAPsol
G	P.A.	- 0.7531	- 0.8086	-- 0.9222		- 0.7209	- 0.8213

TABLAS 30, 31 y 32. Nivel de correlación (r) positiva o negativa, también se indica el grado de significación; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; ó, - $p < 0,05$; -- $p < 0,01$; --- $p < 0,001$.

P.A.: presión arterial, TGL: triglicéridos, CHO: colesterol total, HDL: colesterol-HDL, LDL: colesterol-LDL, T: testosterona, DhT: dihidrotestosterona, E: estradiol.

Todos: Todos los aceites, S: sésamo, G: girasol, P: pescado, O: oliva

+ : correlación positiva, - : correlación negativa

V. Discusión

1. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE PESOS E INGESTA DE AGUA Y ALIMENTO

Como puede apreciarse en la Tabla 6-Gráfica 1 no existieron diferencias significativas entre los valores medios de **peso corporal** de los distintos grupos de animales durante todo el periodo experimental, ni en los valores de peso corporal alcanzados en el momento del sacrificio. De igual manera, tampoco se observaron al sacrificio diferencias estadísticas en los pesos de los distintos órganos internos (expresados ponderalmente en función del peso corporal final; Tabla 7-Gráfica 2), con una excepción, el hígado, que mostró valores inferiores en el grupo del aceite de sésamo frente al de girasol ($p < 0,01$).

Tampoco se establecieron diferencias estadísticamente significativas en los valores de **ingesta media de alimento** para los distintos grupos animales considerados, con excepción de la cuarta semana experimental, donde la ingesta fue algo superior para el grupo de girasol ($p < 0,05$) y para la semana décimo sexta, donde la ingesta fue superior para el grupo que consumía aceite de coco ($p < 0,01$) (Tabla 8-Gráfica 3). En cualquier caso, cuando se consideraron los valores medios de ingesta de alimento para todo el periodo experimental no se establecían diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de grasa consumida.

En concordancia con los resultados obtenidos para la ingesta de alimento y los valores de peso, y teniendo en cuenta que las dietas eran isoenergéticas e isoproteicas, no encontramos diferencias significativas en las ingestas medias energéticas (expresadas en KJ/día), ni en la eficiencia en el uso del alimento (Tabla 9).

Por último, si que aparecieron diferencias estadísticas para los valores medios durante todo el periodo experimental de **ingesta de agua** (g/día), que fueron menores para los animales a los que se les suministró el aceite de pescado y la manteca de cerdo ($p < 0,001$) (Tabla 10-Gráficas 4 y 8). Como veremos más adelante, estos resultados concuerdan con los obtenidos para los valores finales de presión arterial, que también fueron inferiores en estos dos grupos de animales.

2. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA

En la Tabla 11-Gráfica 5 podemos observar la evolución de los valores medios semanales de **presión arterial** para cada uno de los grupos de animales. Diferencias

estadísticamente significativas encontramos en la séptima semana del periodo de alimentación donde ya aparecen valores de presión arterial inferiores para los grupos alimentados con aceite de pescado y con manteca de cerdo ($p < 0,05$), diferencia que vuelve a manifestarse en las semanas décimo primera ($p < 0,05$) y décimo séptima ($p < 0,001$); y que se mantiene cuando consideramos los valores medios obtenidos para cada grupo durante todo el periodo experimental ($p < 0,01$) (Gráfica 7). Este descenso en los valores de presión arterial en animales que consumen aceite de pescado está ampliamente descrito en la bibliografía (Appell y cols. 1993) y parece ser debido a la alta concentración de ácidos grasos de la serie w-3 en este tipo de grasa. Bastante más contradictorio y difícil de explicar es el resultado obtenido en el grupo de animales que consumían la manteca de cerdo. Como hemos indicado con anterioridad, precisamente en estos dos grupos de animales es donde se obtuvieron los valores menores de ingesta de agua (Tabla 10-Gráfica 4).

También se establecieron correlaciones positivas y estadísticamente significativas en el grupo de animales que consumió aceite de girasol entre los valores medios de presión arterial final y niveles totales de colesterol en plasma ($p < 0,001$; $r = 0,4939$) y de colesterol LDL ($p < 0,01$; $r = 0,4510$) (Tabla 31).

En cuanto a la **frecuencia cardiaca**, en la Tabla 12-Gráfica 6 podemos ver la evolución semanal de dichos valores, apreciándose frecuencias estadísticamente superiores para el aceite de girasol frente al aceite de oliva, el coco y la manteca de cerdo ($p < 0,01$) en la tercera semana y para la manteca de cerdo frente al aceite de oliva en la quinta semana ($p < 0,05$); sin que al final del periodo experimental se lleguen a establecer diferencias significativas entre los grupos de animales que consumieron las distintas dietas.

3. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE PARÁMETROS ANALIZADOS EN PLASMA

Actualmente se acepta que el tipo de dieta en general y la composición de ácidos grasos en particular modifica los niveles de colesterol, triglicéridos y esteroides sexuales en plasma. Sin embargo, los resultados con relación al sentido de tal modificación son en algunos casos aparentemente contradictorios y los mecanismos que subyacen a éstos efectos no están del todo dilucidados.

Nuestros resultados demuestran que los niveles de **colesterol total** son mayores cuando se utilizan sésamo, girasol, oliva y coco que cuando se utilizan aceite de pescado o manteca de cerdo (Tabla 13-Gráfica 10). Los niveles de **HDL-colesterol** son mayores al utilizar oliva, manteca de cerdo y coco que al utilizar sésamo, girasol o pescado. Los niveles de **LDL-colesterol** son menores al utilizar manteca de cerdo, en comparación con el resto de aceites entre los que no hay grandes diferencias (Tabla 13-Gráficas 11 y 12). Finalmente, los niveles de **triglicéridos** son muy bajos cuando se utilizan sésamo y pescado y altos cuando se utilizan oliva y girasol (Tabla 13-Gráfica 9). Estos resultados demuestran la importante influencia

que ejerce el tipo de grasa que se utiliza en la dieta sobre los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma.

Los estudios que analizan el efecto de los diferentes ácidos grasos en la dieta sobre los niveles plasmáticos de colesterol ponen en evidencia la heterogeneidad de los resultados dependiendo de diversos factores como la especie en que se realizó el estudio, la concentración de ácido graso utilizado o el período de tiempo en que se prolongó el estudio. Así, en estudios metabólicos se ha demostrado que diferentes clases de ácidos grasos saturados tienen diferentes efectos sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas en plasma (Kris-Etherton y Yu, 1997). En concreto, los ácidos grasos saturados con 12-16 átomos de carbono tienden a incrementar los niveles de colesterol total y LDL-colesterol en plasma. Sin embargo, el ácido esteárico (18:0) no tiene efecto en comparación con el ácido oléico (18:1). Entre los ácidos grasos saturados que aumentan el colesterol, el ácido mirístico parece ser más potente que el láurico o palmítico (Kris-Etherton y Yu, 1997) pero éstos datos han resultado ser poco consistentes (Temme y cols, 1996). Finalmente, aunque el ácido estearico tiene pocos efectos sobre el colesterol total y LDL-colesterol comparado con los hidratos de carbono, puede disminuir el HDL-colesterol comparado con los ácidos grasos mono y poliinsaturados, siendo este efecto particularmente intenso en mujeres.

Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, numerosos estudios metabólicos han demostrado un marcado efecto reductor del colesterol mediante el uso de aceites vegetales ricos en ácido linoleico en lugar del uso de grasa saturada en la dieta (Hu y cols, 2001). Además, un aumento en la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados mejora la sensibilidad a la insulina (Lovejoy, 1999). En este sentido, una alta ingesta de grasa poliinsaturada se ha relacionado con una menor incidencia de diabetes tipo 2 (Hu y cols, 1999).

Finalmente, en relación a los ácidos grasos monoinsaturados, el uso de grasa monoinsaturada en lugar de hidratos de carbono, incrementa el colesterol-HDL sin afectar el LDL (Mensink y Katan, 1992). Esta sustitución puede también mejorar la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes mellitus (Garg y cols, 1992). Además, la grasa monoinsaturada es resistente a la oxidación (Parthasarathy y cols, 1990).

Por otro lado, nuestros resultados demuestran un incremento significativo de los niveles de **testosterona** cuando se utiliza manteca de cerdo en la dieta con respecto al resto de aceites utilizados. Los menores niveles de testosterona se obtuvieron cuando se utilizó aceite de oliva en la dieta, pero no existen diferencias significativas entre ésta dieta y las que contenían aceites de sésamo, girasol, pescado o coco. Los niveles de **dihidrotestosterona**, aunque muestran ligeras diferencias dependiendo del aceite utilizado, éstas no llegan a ser significativas. En cualquier caso, los mayores niveles se obtienen con la utilización de manteca de cerdo y los menores cuando se utiliza aceite de pescado. Finalmente, los niveles de **estradiol** muestran escasas diferencias entre los diferentes grupos de aceites utilizados. Sin embargo, las diferencias alcanzan significación estadística ($p < 0,05$) cuando comparamos el uso

de coco con oliva; siendo la actividad mayor con el uso de aceite de coco (Tabla 13-Gráficas 14-16).

Si analizamos la relación estradiol/testosterona observamos que los valores mayores se obtienen con el uso de girasol y oliva y los menores con el uso de manteca de cerdo. La relación estradiol/dihidrotestosterona exhibe su mayor valor con el uso de pescado y el menor con el uso de manteca de cerdo (Gráficas 17 y 18).

Estos resultados lo primero que indican es un claro efecto del tipo de grasa en la dieta sobre los niveles de esteroides sexuales en el suero de los animales analizados. Esto sugiere que la función testicular y consecuentemente también la fertilidad de éstos animales puede modificarse dependiendo del tipo de aceite que utilicemos en la dieta.

En este sentido, otros autores también han analizado la influencia del tipo de grasa en la dieta sobre la función testicular en mamíferos. Así, la alimentación de ratas con dietas ricas en colesterol o aceite de pescado aumentan la testosterona basal y la síntesis de testosterona estimulada por LH en comparación con ratas alimentadas con una dieta baja en colesterol que contenga aceite de linaza (Sebokova y cols, 1990). También se ha demostrado que la composición de grasa en la dieta influye en la composición de colesterol y fosfolípidos de las membranas plasmáticas testiculares de rata (Sebokova y cols, 1990). La modificación de la composición y propiedades físicas de la membrana puede conducir a modificaciones en la actividad de los enzimas asociados a membrana (Muriana y cols, 1992) y a alteraciones en las propiedades de unión de los receptores de gonadotropinas (Sebokova y cols, 1988).

Los estudios que se han llevado a cabo en humanos demuestran una heterogeneidad en los resultados, algunos de ellos aparentemente contradictorios. Se ha descrito una correlación inversa entre el grado de insaturación de la grasa y los niveles de testosterona. Así, la ingesta de aceite de pescado se ha relacionado inversamente con los niveles de testosterona total (Nagata y cols, 2000). Por otro lado, el uso de una dieta rica en grasa saturada, reductora de quilomicrones postprandiales, da lugar a una reducción prolongada de testosterona que no se ve afectada por la reducción postprandial de quilomicrones (Volek y cols, 2001). Field y colaboradores en 1994 estudiaron la relación entre la dieta y los niveles plasmáticos de diversos esteroides sexuales y cortisol. Los resultados les demostraron que las únicas hormonas asociadas con los lípidos de la dieta fueron dihidrotestosterona, cortisol y SHBG.

Finalmente y en contraste con la mayoría de los autores, Dorgan y colaboradores en 1996, tras evaluar el efecto de la grasa sobre las hormonas sexuales en plasma y orina observaron que la concentración de testosterona total y de SHBG aumentaron tras consumir una dieta alta en grasa durante 10 semanas.

Con respecto a la posible relación entre los niveles de hormonas sexuales y los de los diferentes lípidos en plasma (Tabla 30) se observa una correlación positiva significativa ($p < 0,01$) entre los niveles de HDL-colesterol y los niveles de estradiol

cuando se utiliza aceite de sésamo en la dieta. Sin embargo, esta relación es negativa cuando se utiliza pescado en la dieta y positiva ($p < 0,05$) cuando se relaciona LDL-colesterol y estradiol. Finalmente, el uso de aceite de oliva en la dieta establece una correlación positiva entre HDL-colesterol y dihidrotestosterona ($p < 0,001$) y entre triglicéridos y testosterona ($p < 0,05$), pero la relación es negativa entre HDL-colesterol y estradiol ($p < 0,05$).

4. SOBRE EL EFECTO DEL TIPO DE GRASA DIETÉTICA EN LOS NIVELES DE AMINOPEPTIDASAS

4.1. Actividad Aminopeptidasa en Plasma

En plasma las actividades que aparecen con mayores niveles son la AlaAP y la ArgAP, descritas como angiotensinasas M y por lo tanto, implicadas en el metabolismo de la AngIII. Como puede apreciarse en la Tabla 15-Gráfica 20, ambas muestran un patrón de comportamiento muy similar, con valores mínimos en los animales alimentados con aceite de pescado en comparación con la manteca de cerdo en el caso de la Ala AP ($p < 0,01$) y con la manteca de cerdo y el sésamo en el caso de la ArgAP, donde también se establecen diferencias entre el aceite de coco frente al sésamo y la manteca de cerdo ($p < 0,001$).

Las actividades GluAP y AspAP, ambas degradativas frente a la AngII, presentan también entre ellas un patrón muy similar, donde destacan los valores significativamente mayores ($p < 0,001$) para el aceite de girasol, mientras que el resto de las grasas parecen tender al aumento de estas actividades enzimáticas de manera proporcional a su grado de saturación. Niveles y comportamiento similar ($p < 0,001$) encontramos para la pGluAP, uno de cuyos sustratos es la TRH; y lo mismo parece suceder, aunque los niveles de actividad son algo superiores, con la CysAP ($p < 0,01$) actividad degradativa frente a la vasopresina y la oxitocina.

También es interesante destacar que en los animales alimentados con aceite de girasol se establecen correlaciones estadísticamente significativas y de signo negativo entre los valores de presión arterial al final del periodo experimental y los niveles de la mayoría de las actividades aminopeptidasas estudiadas, con excepción de la GluAP (Tabla 32): AlaAP ($p < 0,05$; $r = -0,7531$), ArgAP ($p < 0,05$; $r = -0,8086$), CysAP ($p < 0,01$; $r = -0,9222$) AspAP ($p < 0,05$; $r = -0,7209$) y pGluAP ($p < 0,05$; $r = -0,8213$). Estos resultados indicarían que al menos para este aceite, parece existir una relación entre dichas actividades y los valores de presión arterial.

4.2. Actividad Aminopeptidasa en Riñón

Sin duda, uno de los tejidos corporales en los que el SRA presenta mayor importancia es en el riñón. Además de la vía clásica de formación de la AngII (Skeggs y cols.

1976; Pickering 1964), este octapéptido es también generado y biotransformado de forma local (Erdos 1990). Por tanto, la AngII es formada tanto a partir del angiotensinógeno liberado sistémicamente como del formado a nivel local. De hecho, tanto el angiotensinógeno como su ARNm han sido localizados en las células de los túbulos proximales del riñón (Gomez y cols. 1988; Darby y Sernia 1995; Ingelfinger y cols. 1990).

El ECA ha sido localizado en las células endoteliales de la vasculatura renal y en las membranas del borde en cepillo de los túbulos proximales (Schulz y cols. 1988). El receptor AT1 está presente en las membranas lumbales y basolaterales de los túbulos, así como sobre los vasos sanguíneos (Allen y cols. 1999). Se ha determinado la concentración intrarrenal de AngII y ésta ha resultado ser sorprendentemente alta (Campbell y cols. 1991), de manera que no pueden ser explicada sólo en base a las concentraciones de AngII circulante. Investigaciones sobre varios modelos de hipertensión en ratas, entre ellos el 2K1C (hipertensión Goldblatt dos riñones un clip) (Navar y cols. 1999) demuestran que debe existir una alta producción local de AngII en el riñón.

Otra serie de experimentos de micropunción han demostrado que las concentraciones tanto de AngI como de AngII en el fluido de los túbulos proximales son mucho mayores que en el plasma; aún no se conoce con certeza su origen, pero parece probable que la AngI y AngII sean producidas por las células de los túbulos y secretadas al lumen. También hay presencia de renina en el fluido del lumen de los túbulos, en las membranas del borde en cepillo y en el interior de las células. Se ha podido demostrar (Henrich y cols. 1996; Moe y cols. 1993) que los cultivos de células tubulares son capaces de producir renina en pequeñas cantidades. Por último, hay niveles bastante elevados de ECA en las membranas del borde en cepillo, lo que explicaría la conversión de la AngI en AngII.

En conjunto, todas estas observaciones sugieren que el SRA tisular local debe cumplir un importante papel en la regulación de la función renal. Experimentos realizados con bloqueantes del receptor AT1 han demostrado un incremento en el flujo de sangre renal, en la tasa de filtración glomerular y en la excreción de sodio (Cervenka y cols. 1999). La administración intraluminal, tanto de bloqueantes del AT1 como de inhibidores del ECA, reducen la tasa de reabsorción de sodio en los túbulos proximales (Quan y cols. 1996). Estudios de microperfusión sugieren que la AngII es también un importante regulador de la reabsorción distal (Wang y Giebisch 1996; Barreto-Chaves y Mello-Aires 1996). Por lo tanto, parece que la AngII juega un importante papel regulador intrarrenal a lo largo de toda la nefrona.

Se sabe que cambios en el SRA local pueden estar relacionados con la aparición de la hipertensión. En ratas 2K1C el candesartan, un bloqueante del receptor AT1, ha demostrado ser capaz de disminuir la presión arterial de forma dosis-dependiente. Esta droga incrementa el flujo de sangre renal y disminuye la resistencia vascular intrarrenal, aumentando de forma paralela la excreción urinaria de sodio. Resultados similares se han obtenido con el valsartan, otro inhibidor del receptor AT1, que ha demostrado disminuir la presión arterial sistólica en ratas hipertensas del modelo Goldblatt 2K1C (Hermoso Calatrava F. Tesis Doctoral. 2001).

Se sabe que muchas de las alteraciones en la función renal están influidas por distintos factores dietéticos como la ingesta total de calorías, el fósforo, el cloro o el potasio, la ingesta de proteína y de ácidos grasos poliinsaturados (Brown y col., 1998). Existen evidencias de la relación entre los ácidos grasos y el SRA en el riñón, ya que se ha comprobado que los ácidos grasos poliinsaturados inhiben al ECA al mismo tiempo que estimulan la síntesis de óxido nítrico (Kumar y Das, 1997). Algunos tipos de nefropatías (como la nefropatía por inmunoglobulina A) pueden mejorar su pronóstico mediante la administración de aceite de pescado, efecto que parece basarse en el hecho de que los ácidos grasos poliinsaturados de tipo ω -3 pueden limitar la producción o la acción de las citocinas y los eicosanoides liberados durante el daño renal (Donadio 2000).

Nuestros resultados indican que el tipo de ácidos grasos dietéticos, determinado por la clase de aceite utilizado, pueden afectar a distintas actividades aminopeptidasas a nivel renal. En la corteza renal encontramos que la manteca parece determinar menores niveles de AspAP frente al aceite de oliva ($p < 0,05$) en la fracción soluble, mientras que en la fracción unida a membrana se obtuvieron niveles significativamente menores para el girasol cuando se compara con el pescado ($p < 0,05$) (Tabla 16-Gráfica 21).

En la médula renal la actividad ArgAP soluble fue superior para la manteca ($p < 0,05$). En la fracción unida a membrana encontramos los mayores niveles de AlaAP tras el consumo de sésamo ($p < 0,05$), y el girasol determina los menores niveles de actividad CysAP cuando se compara con las dos grasas saturadas (manteca y coco, $p < 0,01$). No obstante, las variaciones más significativas se localizaron en la médula renal para las actividades GluAP, AspAP y pGluAP. La actividad GluAP soluble aparece inferior en los animales que consumieron manteca de cerdo y aumenta en el grupo de coco ($p < 0,001$). En la fracción de membrana sólo encontramos diferencias entre el sésamo y el girasol ($p < 0,05$). La actividad AspAP soluble y unida a membrana muestran el mismo efecto obteniéndose los menores niveles con girasol y manteca frente al resto de grasas ($p < 0,001$), aunque en la fracción soluble sólo muestra diferencias significativas con el girasol ($p < 0,01$) (Tabla 17-Gráfica 22).

Tanto la actividad GluAP como la AspAP se han descrito como degradativas de la AngII (Nagatsu y cols., 1970), por lo que sus menores niveles tras el consumo de manteca y girasol podrían relacionarse con un metabolismo disminuido de este péptido en la médula renal. En la médula renal se ha propuesto la existencia de un nuevo receptor capaz de fijar tanto a la AngII como a la vasopresina. Parece tratarse de una nueva isoforma del receptor AT1 que responde con igual sensibilidad a los dos péptidos, e intervendría en los efectos estimulantes de la reabsorción de sodio y agua a nivel medular que presentan tanto la AngII como la vasopresina (González y cols., 1997). La menor actividad angiotensinasa A podría aumentar el tiempo de actuación de la AngII, estimulando se esta forma la reabsorción de agua y sodio.

Por último, la actividad pGluAP en la fracción soluble presenta una actividad menor con el girasol ($p < 0,01$), y es interesante destacar que la pGluAP de membrana fue indetectable en los animales alimentados con girasol y con manteca (Tabla 17-

Gráfica 22). Esta menor actividad degradativa de TRH prolongarían la acción de esta hormona en el riñón, relacionada con una disminución en la excreción de sal y agua, así como en la filtración glomerular y el flujo plasmático renal (Garland, 1987).

4.3. Actividad Aminopeptidasa en Aorta

Se ha estudiado la existencia de un SRA tisular propio de la pared vascular, llevándose a cabo los trabajos principalmente en vasos del riñón, espláncnicos y en los vasos cardiacos (Ganten y cols. 1970; 1972). Las primeras evidencias de la existencia de estos sistemas locales se tuvieron tras realizar infusiones de los vasos sustituyendo el fluido sanguíneo por una solución que contenía renina, lo que permitió comprobar la existencia de angiotensinógeno en los mismos y su transformación a AngI (Mullër y cols. 1995). Además, tras cesar la infusión continuaba la generación de AngI, lo que demostraba la existencia de la propia renina en la pared vascular. Posteriormente se demostraría la existencia del ECA en la pared vascular, no necesariamente del pulmón, y su papel en el control de los niveles de AngII (Mullër y cols. 1997).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos observar cómo la calidad de la grasa dietética es capaz de alterar la actividad de distintas aminopeptidasas en la pared del cayado aórtico de la rata, tanto en su fracción soluble como unida a membrana. Claramente, el tipo de grasa afecta a las actividades relacionadas con el SRA. (Tabla 18-Gráfica 23).

La actividad AlaAP, en la fracción soluble, presenta mayores niveles de actividad con el sésamo, girasol y pescado (grasas poliinsaturadas) frente al aceite de oliva, coco y manteca de cerdo (grasas monoinsaturadas y saturadas) ($p < 0,001$). Sin embargo en la fracción de membrana el patrón parece invertirse, alcanzándose las mayores actividades con el aceite de oliva y el coco ($p < 0,01$). La actividad ArgAP soluble no muestra diferencias, y la de membrana parece comportarse de forma similar a la AlaAP, con excepción del aceite de sésamo ($p < 0,001$) (Tabla 18-Gráfica 23).

La actividad GluAP soluble es menor en los animales alimentados con aceite de girasol ($p < 0,01$) frente al pescado y el aceite de oliva, y lo mismo ocurre en la fracción de membrana, aunque en éste caso la diferencia sólo se mantiene frente a la grasa monoinsaturada ($p < 0,01$). Patrones muy similares encontramos para la actividad AspAP soluble ($p < 0,01$) y unida a membrana ($p < 0,05$).

Trabajos recientes demuestran que la AngII es capaz de inducir daño vascular, y que además dicho efecto es mediado localmente, es decir, se debe a la AngII producida en la propia pared vascular. La combinación de inhibidores del ECA y de bloqueantes del receptor AT1 normalizan la presión arterial al tiempo que protegen del daño vascular. Los inhibidores de la renina disminuyen sólo parcialmente la presión sanguínea, pero también protegen completamente del daño vascular. Existen evidencias de que la AngII es capaz de estimular directa o indirectamente el estrés oxidativo. Además, se sabe que estos daños son debidos directamente a la AngII,

y no un efecto del aumento de la presión arterial, de hecho, cuando la presión arterial disminuye por tratamientos que no incluyen a los inhibidores del SRA el daño vascular no desaparece (Mervaala y cols. 2000).

Los trabajos realizados parecen demostrar una clara relación entre el SRA y las enfermedades coronarias, e indican que la AngII posee efectos celulares directos sobre el miocardio y las arterias coronarias, que desembocarían en aterosclerosis, hiperplasia intimal, isquemia, etc. Parece que son muchos los mecanismos que contribuyen a esta relación: crecimiento y migración de las células musculares lisas, inducción de la disfunción endotelial, potenciación del efecto aterogénico del colesterol, alteración del balance fibrinolítico, etc (Guzmán 2000). Ya a principios de la década de los 90 algunas publicaciones hablaban de la relación entre los niveles plasmáticos de renina y el riesgo de sufrir infarto agudo de miocardio (Alderman y cols. 1991; Laragh 1992). Actualmente se sabe que la AngII es capaz de incrementar el estrés oxidativo en la pared endotelial, inducir la proliferación celular, actuar como agente proinflamatorio e interferir en la coagulación sanguínea (Dzau 1998), aunque los mecanismos precisos mediante los cuales la AngII puede afectar a la estructura y función de las arterias no son totalmente conocidos.

Por otra parte, la activación de SRA, por ejemplo en el caso de hipertensión arterial, se ha relacionado con una disminución en la producción y en la actividad del ON, y por lo tanto de sus propiedades protectoras del endotelio; de hecho, el ON tiene propiedades vasodilatadoras, antiagregantes plaquetarias e inhibidoras del crecimiento y la migración celular, por lo que su acción podría tener efectos antiaterogénicos (Ribeiro y cols. 1992). Se ha observado que la AngII es capaz de aumentar la producción de radicales libres como el anión superóxido (Griendling y cols. 1997) que reaccionaría con el ON dando lugar a alguno de los radicales libres más dañinos para la pared vascular (Cosentino y cols 1998).

También se sabe que existe una relación entre el SRA y la oxidación de las lipoproteínas LDL y su captación por los macrófagos. Parece que la AngII favorece la oxidación de las LDL (Keidar y cols. 1994; Strawn y cols. 2000) y la aparición de las células espumosas. La AngII podría estar implicada en fases posteriores de la formación de la placa de ateroma, ya que son bien conocidos sus efectos proliferativos directos o a través del IGF-1 (Paquet y cols. 1990).

Por último, la AngII es también capaz de interactuar con el sistema fibrinolítico, ya que es capaz de aumentar la expresión del inhibidor del activador tisular del plasminógeno 1 (PAI-1) (Van Leeuwen y cols. 1994) al mismo tiempo que la AngIV a través del receptor AT4 es capaz de interactuar con el activador tisular del plasminógeno (tPA) y el PAI-1 (Kerins y cols. 1995). Todos los mecanismos citados, actuando de manera conjunta, son claros favorecedores del desarrollo de la aterosclerosis, por lo que podríamos afirmar que cualquier factor capaz de alterar el equilibrio entre los distintos péptidos activos del SRA, y en especial las cantidades de AngII, podría relacionarse con la aparición y desarrollo de la placa de ateroma; por consiguiente, variaciones en las actividades aminopeptidasas involucradas en el metabolismo de las angiotensinas podría influir en el desarrollo de la aterosclerosis.

Nuestros resultados apuntarían a una disminución en las actividades degradativas de la AngII (GluAP y AspAP) con el consumo de aceite de girasol frente al aceite de oliva y de pescado, grasas que han demostrado su acción protectora frente a la formación de la placa de ateroma. Al mismo tiempo, aparecen incrementadas las actividad catabólicas de la AngIII en la fracción soluble con los aceites más insaturados (sésamo, girasol y pescado), y por el contrario con la grasa monoinsaturada y saturada en la fracción de membrana, lo que podría alterar los niveles de AngIII y AngIV. No obstante, en las preparaciones histológicas de las aortas obtenidas a partir de animales alimentados con aceite de pescado o con manteca de cerdo (figuras 6-11, página 83) en ningún caso se observan alteraciones en la morfología de la pared vascular, lo que podría estar relacionado con el relativamente bajo porcentaje de grasa utilizado en estos experimentos.

También encontramos variaciones en la actividad pGluAP soluble, que muestra sus menores niveles con el aceite de girasol y las grasas saturadas ($p < 0,01$), y en la fracción unida a membrana que parece seguir un patrón bastante similar ($p < 0,001$) (Tabla 18-Gráfica 23). La pGluAP actúa como actividad degradativa y reguladora de los niveles de TRH, hormona que parece intervenir en la regulación del crecimiento y en el control del tono vasomotor del sistema cardiovascular (Shi y cols., 1996).

4.4. Actividad Aminopeptidasa en Corazón

Al igual que hemos visto en tejidos anteriores, todos los componentes del sistema renina-angiotensina se expresan y localizan en el corazón, por lo tanto, podemos afirmar la existencia de un sistema local en este órgano (Lindpaintner y Ganten 1991).

El angiotensinógeno se expresa en todo el corazón y en cultivos de miocitos y fibroblastos cardiacos (Sawa y cols. 1992). La renina y su ARNm están presentes en la aurícula y el ventrículo, así como en cardiomiocitos de distintas especies, incluida la humana (Endo-Mochizuki y cols. 1995), aunque no está muy claro cual es la fuente de renina cardiaca, ya que los niveles de ARNm no son muy altos, además de que tanto la renina como la prorenina circulantes son captadas eficientemente por el corazón, y podrían ser la fuente mayoritaria para la generación de AngI (Müller y cols. 1998). También se sabe que existen vías alternativas a la renina para la formación de angiotensinas cardiacas, por ejemplo, enzimas como las catepsinas son capaces de liberar angiotensinas a partir del angiotensinógeno (Gondo y cols. 1989); sin embargo, al menos en ratas, se ha comprobado que la nefrectomía bilateral tiene como consecuencia la pérdida de la AngII cardiaca, lo que apoyaría la hipótesis de que la renina liberada por el riñón sería la principal fuente para la formación de AngI en el corazón (Danser y cols. 1994).

Por su parte, el ECA es producido en los tejidos cardiacos, principalmente en los fibroblastos y el endotelio (Katwa y cols. 1995), pero igual que en el caso de la renina, su importancia ha sido cuestionada ya que en el corazón la quimasa también

cataliza la misma reacción transformando la AngI en AngII, y parece que ésta es la vía mayoritaria de formación (Urata y cols. 1990). No obstante, todos los elementos necesarios para la generación de AngII local están presentes en el corazón.

En trabajos realizados con anterioridad en nuestro laboratorio (Hermoso 2001, Tesis Doctoral), se demostró la presencia de actividades angiotensinasas frente a la AngII (GluAP y AspAP) y la AngIII (AlaAP y ArgAP) en aurícula derecha y ventrículo izquierdo en el corazón de rata, y que tanto la hipertensión de tipo Goldblatt dos riñones un clip (G2R1C) como el tratamiento con valsartan, un bloqueante del receptor AT1, afectaban a dichas actividades.

También se ha descrito la presencia de los dos tipos de receptores en el corazón, AT1 y AT2 (Sechi y cols. 1992), y mediante la interacción con ellos la AngII ejerce sus efectos inotrópicos e hipertróficos en el tejido cardiaco. A nivel molecular, dichos efectos inotrópicos son llevados a cabo a través de sus acciones sobre la homeostasis del calcio y la conductancia de las membranas (Bonnardeaux y Regoli 1974).

Bastante más importancia parecen tener los efectos hipertróficos de la AngII sobre los cardiomiocitos, en los que potencia la síntesis de ADN y la proliferación. Existen evidencias de que la AngII producida localmente participa en la inducción del crecimiento de los cardiomiocitos y en la hipertrofia cardiaca (Nagano y cols. 1991). En algunos modelos animales, los cambios en el tamaño del corazón no se correlacionan con la presión sanguínea ni con los niveles de AngII plasmática, pero si lo hacen con las concentraciones de AngII en el corazón (Böhm y cols. 1996).

En nuestros resultados, y tal y como se puede ver en la tabla 7, no aparecen diferencias significativas ($p=0,1596$) en el peso del corazón, expresado en g/ 100 g de peso vivo del animal, al igual que tampoco aparecían diferencias significativas al final del periodo experimental ($p=0,6889$) en la frecuencia cardiaca (Tabla 12-Gráfica 6), aunque si que encontramos valores estadísticamente inferiores ($p<0,001$) de presión arterial para los animales que consumieron el aceite de pescado y la manteca de cerdo (Tabla 11-Gráfica 5).

También se han estudiado las implicaciones del SRA cardiaco en la remodelación del miocardio tras un infarto, ya que este proceso consiste básicamente en una hipertrofia (Pfeffer 1995). Estudios realizados con paciente que presentaban disfunción ventricular izquierda después de un infarto de miocardio demuestran que tanto los inhibidores del ECA como los bloqueantes del receptor AT1 presentan un efecto claramente protector (Pitt y cols. 2000). La importancia del ECA en la etiología de las enfermedades cardiacas se ha comprobado en numerosos estudios. Utilizando preparaciones de corazones aislados se ha podido demostrar que las arritmias postisquémicas se pueden prevenir con inhibidores del ECA; es más, el flujo coronario y la función ventricular mejoran en modelos experimentales en los que los inhibidores del ECA bloquean exclusivamente la formación de AngII tisular cardiaca.

En lo que se refiere al efecto de la AngII sobre el crecimiento de los cardiomiocitos, se sabe que la mayor parte de los efectos hipertróficos de la AngII son mediados

por el receptor AT1 a través de distintas vías intracelulares (Dostal 2000). También se sabe que la formación local de AngII induce daño cardiaco independientemente de la elevación de la presión sanguínea (Mazzolai y cols. 1998), aunque no todas las especies animales presentan la misma sensibilidad a este efecto.

De forma paralela a la hipertrofia, numerosos estímulos pueden inducir la fibrosis cardiaca, o lo que es lo mismo, la proliferación de los fibroblastos cardiacos y la excesiva deposición de matriz extracelular (Booz y Baker 1995). Como consecuencia aparece disfunción ventricular y finalmente fallo cardiaco, principalmente por disfunción diastólica. La AngII también está directamente relacionada con el desarrollo de la fibrosis cardiaca (Booz y Baker 1995), ya que la infusión crónica de AngII induce la fibrosis, y ésta puede ser evitada por los inhibidores del ECA y por los bloqueantes del AT1.

A pesar de todo lo expuesto, es poco lo que actualmente se conoce sobre el papel de las aminopeptidasas en la regulación de los niveles tisulares de angiotensinas cardiacas, y aún menos sobre el posible efecto que el tipo de grasa en la dieta pudiera tener sobre estas actividades, aunque es muy bien conocida la importancia de los factores dietéticos, y entre ellos particularmente el tipo de grasa, sobre la incidencia de determinadas enfermedades cardiacas (Kromhout, 2001), particularmente las fuentes lipídicas ricas en ácidos grasos saturados o ácidos grasos de tipo trans, por su efecto sobre el perfil de lipoproteínas plasmáticas, aunque puede que no sea éste el único efecto de los distintos tipos de ácidos grasos.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede observar como el tipo de grasa ingerida por los animales es capaz de modificar los niveles de actividad de las angiotensinas, tanto en aurícula como en ventrículo, siendo además los resultados dispares en ambos tejidos.

En aurícula (Tabla 20-Gráfica 24) los resultados estadísticamente más significativos los encontramos para la actividad ArgAP de membrana que muestra niveles mayores ($p < 0,001$) con el aceite de coco frente a las grasas más insaturadas (sésamo, girasol y pescado), para la actividad GluAP de membrana con mayores niveles ($p < 0,001$) con el aceite de oliva en comparación con el sésamo, girasol, manteca y coco; y para la actividad AspAP, también de membrana, que sigue un patrón similar al de la GluAP, aunque es este caso las diferencias estadísticamente significativas se establecen sólo frente al sésamo y al girasol ($p < 0,001$).

Merecen ser destacados los altos niveles de actividad GluAP y AspAP de membrana en la aurícula de los animales alimentados con aceite de oliva, ya que estas actividades enzimáticas actúan transformando la AngII en AngIII, por lo que podrían determinar una menor vida media de éste péptido, disminuyendo sus posibles efectos sobre el crecimiento de los miocitos y la fibrosis cardiaca. Este efecto podría estar relacionado con el conocido papel beneficioso del consumo de aceite de oliva sobre las enfermedades cardiovasculares isquémicas, y en particular sobre los accidentes coronarios, que se ha puesto de manifiesto en distintos estudios epidemiológicos (Bernard y cols., proyecto MONICA, 1987) y que parece no estar en relación únicamente con las variaciones en los lípidos plasmáticos.

En el ventrículo (Tabla 19-Gráfica 25) la actividad AlaAP y ArgAP de membrana muestran sus niveles más elevados con el aceite de girasol frente al sésamo, pescado y oliva ($p < 0,001$). La actividad GluAP soluble aparece significativamente superior con el aceite de girasol y la manteca de cerdo ($p < 0,001$) al igual que ocurre con las actividades AspAP tanto solubles como de membrana ($p < 0,001$). La mayor actividad angiotensinasa A (GluAP y AspAP) en los animales pertenecientes a los grupos girasol y manteca de cerdo podría favorecer la degradación de la AngII a AngIII, al mismo tiempo que, en el caso concreto del aceite de girasol, el incremento concomitante de la angiotensinasa M (AlaAP y ArgAP), al menos a nivel de membrana, podría favorecer el paso de AngIII a AngIV, y por lo tanto, podría traducirse en una activación del SRA cardiaco.

En ventrículo también encontramos resultados interesantes para la actividad degradativa de vasopresina y para la pGluAP (Tabla 19-Gráfica 25). La CysAP soluble presentó mayor actividad en los animales que consumieron el aceite de girasol en comparación con los que ingirieron el resto de grasas ($p < 0,001$), diferencia que se mantuvo (excepto con la manteca) en la fracción de membrana ($p < 0,001$). Este efecto podría favorecer la degradación de la vasopresina tisular local, que se ha relacionado con un aumento de la presión arterial en algunos modelos animales de hipertensión (Lariviere y cols., 1988).

Por su parte, la actividad pGluAP, activa frente a la TRH, fue superior tras el consumo de girasol tanto en la fracción soluble como en la unida a membrana ($p < 0,001$), lo que sugeriría un papel de este péptido en la función ventricular. Se ha detectado la presencia de TRH en el corazón de rata, y la administración de esta hormona estimula la contracción cardiaca, además, hay estudios que demuestran la presencia de receptores para la TRH en los cardiomiocitos ventriculares, lo que apoya que este péptido actúe estimulando la contracción ventricular y en la regulación del crecimiento y el tono vasomotor en el sistema vascular cardiaco (Shi, 1996).

4.5. Actividad Aminopeptidasa en Testículo

La función testicular en los mamíferos está bajo el control de las gonadotropinas hipofisarias, pero los mecanismos de control auto/paracrino de diversos factores locales son también importantes en la regulación testicular (Sharpe, 1986). En éste sentido, entre otros se han identificado a nivel testicular diversos componentes del sistema-renina-angiotensina (SRA) (Speth y cols, 1999); las neurohormonas vasopresina y oxitocina también se ha demostrado que se sintetizan localmente a nivel testicular (Inaba y cols, 1999) e igualmente, la TRH también se sintetiza localmente en el testículo (Zhang y cols, 1995). Se especula que éstos y otros factores pudieran tener un papel importante en la regulación de la función testicular.

El nivel circulante o tisular de un determinado péptido, es el resultado de un equilibrio entre su secreción y degradación. Así, el estado funcional de estos péptidos bioactivos depende no sólo de su secreción sino también de su inactivación o procesamiento

mediante la acción de enzimas proteolíticos tales como las aminopeptidasas (AP). Estos enzimas juegan un importante papel en la regulación del SRA (Barret y cols., 1998), de las hormonas oxitocina y vasopresina (Itoh y Nagamatsu, 1995) y de la TRH (Cummins y O'Connor, 1998).

Se ha sugerido que la composición grasa de la dieta influye sobre la función reproductora en varones al modificar el número de espermatozoides por eyaculado (Surai y cols., 2000) y también influye en la composición en colesterol-fosfolípidos de las membranas plasmáticas testiculares de ratas (Sebokova y cols., 1988). Además, modificaciones en la composición de ácidos grasos de la dieta influyen en el metabolismo de las prostaglandinas y en la fertilidad (Abayasekara y Wathes, 1999).

Estudios in vitro han demostrado que el colesterol y las hormonas esteroideas afectan a las actividades de las aminopeptidasas (Martínez y cols., 1998). Además, se ha demostrado que los detergentes (sustancias de naturaleza anfipática al igual que los ácidos grasos) también alteran la actividad de aminopeptidasas in vitro (Alba y cols., 1995). En estudios recientes en suero de ratón, la GluAP y AspAP, modifican sus actividades dependiendo del tipo de ácidos grasos usados en la dieta (Arechaga y cols., 2001) y la suplementación con aceite de oliva afecta las actividades aminopeptidasas en testículo de ratón (Ramírez-Expósito y cols., 2001).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, en la presente investigación trabajamos con la hipótesis de que el tipo de ácidos grasos utilizados en la dieta podría afectar a las actividades degradativas de angiotensinas (GluAP, AspAP, AlaAP, y ArgAP), de oxitocina y vasopresina (CysAP), y de TRH (pGluAP) en la fracción soluble (sol) y unida a membrana (mb) de testículo de rata, y en consecuencia podría influir sobre las funciones reproductoras en las cuales están implicados estos péptidos locales.

Según los resultados obtenidos, en general, las actividades de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, pGluAP solubles y AlaAP y ArgAP unidas a membrana muestran sus mayores niveles con el uso de manteca y girasol en la dieta y los menores con el resto de aceites. Por otro lado, GluAPsol, GluAPmb, AspAPmb y pGluAPmb, muestran sus mayores niveles de actividad con girasol, manteca y coco y finalmente, los mayores niveles de actividad para CysAPmb se obtuvieron con manteca y oliva. En términos generales, girasol y manteca, y en algunos casos también coco, incrementan los niveles de actividad aminopeptidásica mientras que sésamo, pescado y oliva (excepto en el caso de CysAPmb para oliva) los reducen (Tabla 21-Gráfica 26).

La angiotensina II (AngII) es el principal péptido del SRA y es principalmente metabolizada por la glutamato aminopeptidasa (GluAP) y por la aspartato aminopeptidasa (AspAP) (Barret y cols., 1998), convirtiéndose en angiotensina III (AngIII), la cual a su vez es metabolizada por la AlaAP y por la ArgAP para dar lugar a la Ang IV. Además la AspAP es el principal enzima que metaboliza la angiotensina I a des-Asp-AngI (Sim y cols, 1994). Recientemente, se ha demostrado que el receptor para la Ang IV (AT4) se corresponde con una aminopeptidasa unida a membrana, anteriormente conocida como Aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), que a su vez se corresponde con la oxitocinasa (CysAP) (Albiston y cols,

2001). Aunque los mecanismos permanecen aún poco conocidos, diversas evidencias sugieren que el SRA juega un papel importante en la fertilidad masculina (Speth y cols., 1999). Así, se han demostrado receptores AT1 para la Ang II en los espermatozoides en fase de desarrollo y en los eyaculados (Vinson y cols., 1995) y además, la Ang II parece estimular la motilidad espermática (O'Mahony y cols., 2000). Además, el isoenzima testicular del enzima convertidor de angiotensina (ECA) ha sido también asociado con la fertilidad masculina (Esther y cols., 1997).

Por lo tanto, nuestros resultados, en términos generales, sugieren que el uso principalmente de manteca de cerdo en la dieta incrementa el metabolismo de las angiotensinas, reduciendo por tanto la vida media de éstos péptidos. Consecuentemente se podría sugerir una acción inhibitoria de la función que ejercen las angiotensinas en general sobre la función testicular con el uso de manteca en la dieta. Sin embargo, según los resultados, el uso de aceites en la dieta del tipo de sésamo, oliva o pescado, disminuyen el metabolismo de las angiotensinas con lo cual se incrementa la vida media de éstos péptidos prolongando su actividad y favoreciéndose de ésta forma su función.

El papel de la CysAP (oxitocinasa) está bien establecido como actividad degradativa de la oxitocina (OX) y de la vasopresina (VS)—(Itoh y Nagamatsu, 1995). Las hormonas neurohipofisarias OX y VS están implicadas respectivamente en funciones reproductoras y de control de la homeostasis del agua y la presión arterial, pero también se sintetizan localmente en el testículo donde podrían ejercer funciones reguladoras del metabolismo de andrógenos y consecuentemente de la fertilidad (Inaba y cols., 1999). Estudios anteriores implicaban a la VS como un factor negativo para la producción de andrógenos (Adashi y Hsueh, 1981), sin embargo, recientemente se cuestiona la importancia fisiológica de este factor en el testículo (Assinder y cols., 2000). Por el contrario, se reconoce la implicación de la OX en el control local de la biosíntesis de andrógenos al disminuir la concentración de testosterona y aumentar la de 5 α -dihidrotestosterona (DHT) (Inaba y cols., 1999).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el uso de manteca y oliva (en el caso también de la CysAPmb) incrementa el metabolismo de la OX inhibiendo consecuentemente su acción estimuladora en la producción de DHT. Por el contrario, aceites del tipo de sésamo o pescado reducirían, en comparación a los anteriores, la inactivación de la OX y por tanto el metabolismo de la testosterona. Esto podría tener repercusiones en la función reproductora masculina.

Por otro lado, la función de la TRH, está en parte regulada por la actividad piroglutamil aminopeptidasa (pGluAP) al eliminar el pGlu terminal (Cummins y O'Connor, 1998) de éste péptido. La TRH ha sido localizada en testículo de mamíferos donde podría ejercer una función local sobre la esteroidogénesis testicular por acción auto/paracrina (Zhang y cols., 1995; Montagne y cols., 1999). Nuestros resultados indican que el uso de girasol, manteca o coco incrementan la actividad de pGluAP y por tanto disminuirían la función local de la TRH. Sin embargo, el uso de sésamo, pescado o oliva disminuyen, comparativamente con los anteriores, el metabolismo de la TRH a nivel testicular, incrementando de esta forma la función local que ejerza este péptido.

4.6. Actividad Aminopeptidasa en Tejido Nervioso

Es bien conocido que el tipo de grasa consumida con la dieta afecta a la composición en ácidos grasos de las membranas celulares, particularmente de las membranas cerebrales (Weisinger y cols. 1995; Suzuki y cols. 1998). En concreto, se sabe que la fracción de fosfolípidos del cerebro normalmente contiene muy poca cantidad de ácido linoleico (Tinoco 1982), mientras que la proporción de ácido araquidónico es bastante más significativa. Pero sin lugar a dudas, el ácido graso más representativo de las estructuras cerebrales es el docohexanoico (DHA) (López y cols. 1995; Youdim y Deans 2000). Para que los citados efectos se manifiesten, en el caso de animales aún en etapa de desarrollo, el periodo de suplementación puede ser de tan sólo unas pocas semanas, lo que se ha podido comprobar en ratones (Lui y Longmore 1997) y pollos (Anderson y Connor 1994). En el caso de animales adultos el periodo de suplementación necesario puede ampliarse a ocho semanas (Boure y cols. 1990; McGee y cols. 1994). Por último, también se sabe que el rango de concentración lipídica en las dietas necesario para producir dichos cambios es bastante amplio, entre el 5 y el 20%.

Lógicamente, el efecto esperado depende del tipo de grasa que se emplee, siendo el aceite de pescado el que hasta el momento ha demostrado tener efectos más marcados sobre la composición cerebral, y en particular sobre el contenido en DHA. Es interesante destacar que las citadas variaciones en el contenido de ácido docohexanoico (DHA) parecen ser recíprocas a las que experimenta el ácido docosapentanoico (DPA). Así, hay autores que han encontrado que animales alimentados con dietas deficientes en ω -3 muestran cantidades considerablemente menores de DHA en su corteza cerebral que los que eran alimentados con dietas balanceadas, siendo además esta disminución compensada por un aumento paralelo en las cantidades de DPA.

Tomados en conjunto, todos estos resultados parecen sugerir que en el cerebro es necesario un alto grado de instauración, que normalmente es proporcionado por la presencia de DHA, y que cuando existe una carencia en este tipo de ácido graso es compensada por una mayor incorporación de DPA. Es más, la carencia dietética en cerebro aparece mucho antes que en otros órganos como por ejemplo el hígado o el corazón, lo que demuestra la esencialidad de este tipo de ácido graso para las membranas cerebrales, y apunta el importante papel que debe de jugar en las funciones cerebrales (Yamamoto y cols. 1991; Kaplan y Greenwood 1998).

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles a los procesos de peroxidación lipídica, los cuales podrían alterar la permeabilidad de las membranas, así como oxidar importantes proteínas interfiriendo, por lo tanto, en los movimientos de transporte iónico y en el metabolismo celular (Mason y cols. 1997; Tirosh y cols. 1997).

Entre las actividades enzimáticas más estudiadas hasta el momento se encuentra la fosfolipasa A_2 (PLA₂), la cual parece estar estrechamente relacionada con el DHA

(Jones y cols. 1997; Martín 1998; Shikano y cols. 1993). Por ejemplo, se ha demostrado que la suplementación con DHA en cultivos celulares atenúa la actividad PLA₂, mientras que la suplementación con EPA parecía no tener efecto (Shikano y cols. 1993). Los mecanismos exactos que subyacen a este fenómeno aún no se conocen, pero como consecuencia, tendría lugar una disminución en los niveles de AA (ácido araquidónico) liberado, un paso limitante en la síntesis de eicosanoides biológicamente activos. La disminución en los niveles de PLA también puede tener importantes implicaciones cuando se considera el papel que esta actividad juega en la isquemia (Martín 1998).

En los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos comprobar como el tipo de grasa incluida en la dieta parece afectar a varias de las actividades aminopeptidasas estudiadas a nivel cerebral ($p < 0,001$). Además, estos efectos son claramente distintos en los dos tejidos estudiados, corteza frontal (Tabla 22-Gráfica 27) e hipotálamo (Tabla 23-Gráfica 28).

En la corteza frontal, excepto para las actividades AspAP y pGluAP solubles, que tuvieron menores valores con el aceite de girasol, parece existir una tendencia general a que las actividades solubles disminuyan con el grado de saturación de la grasa dietética (Gráfica 27). En la fracción unida a membrana el comportamiento es distinto: las actividades AlaAP y ArgAP muestran sus mayores niveles con las grasas más saturadas, mientras que el resto de las actividades siguen un patrón heterogéneo, con niveles generalmente inferiores para el aceite de girasol y la manteca de cerdo.

En el hipotálamo, las actividades AlaAP, ArgAP y CysAP, tanto solubles como unidas a membrana, presentaron un comportamiento similar al descrito para la corteza frontal. El comportamiento del resto de las actividades parecía no adaptarse a un patrón claro (Gráfica 28).

Los resultados más llamativos que podríamos destacar serían los cambios en algunas de las actividades determinadas dependiendo del grado de saturación de la dieta: CysAP sol ($p < 0,001$), AlaAP mb ($p < 0,001$) y ArgAP mb ($p < 0,001$) en corteza frontal; AlaAP mb ($p < 0,001$) y ArgAP mb ($p < 0,05$) en hipotálamo; junto con los valores sorprendentemente bajos que se obtuvieron para algunas de las actividades con el aceite de girasol: AspAP y pGluAP tanto sol como mb en corteza frontal y GluAPsol y mb en hipotálamo.

Entre los distintos sistemas de neuropéptidos que podrían verse afectados por estas variaciones, inducidas en las actividades aminopeptidasas por el tipo de grasa en la dieta, sin lugar a dudas uno de los más interesantes es el sistema renina angiotensina cerebral.

La relación entre el SRA circulante y el sistema nervioso central fue demostrada por primera vez por los estudios de Bickerton y Buckley en 1961. Estos estudios demostraron que la Ang II era capaz de actuar a nivel cerebral incrementando la liberación de catecolaminas en la periferia. Además, la simpatectomía o el tratamiento con reserpina atenuaba la respuesta de la presión arterial a la angiotensina, por lo

que debía existir una relación entre la Ang II y el sistema nervioso simpático (Zimmerman 1962). Trabajos posteriores fueron demostrando la estrecha relación entre la Ang II y el sistema nervioso autónomo, y que esta relación puede establecerse dentro del propio cerebro.

Posteriormente, Ganten y colaboradores en 1971 demostraron que la Ang II podía producirse dentro del cerebro y que, además, podría jugar un importante papel en el desarrollo de la hipertensión. La importancia funcional de este sistema local es en la actualidad un tema en el que se centran numerosas investigaciones, más si tenemos en cuenta que el cerebro es único al estar separado de la circulación por la barrera hematoencefálica. La confirmación de la presencia de los componentes de un SRA cerebral se obtuvo al comprobar la presencia de ARNm en el cerebro, y por lo tanto la expresión, del gen que codifica el Angiotensinógeno (AOPEN) (Campbell y cols. 1984). Además, la expresión está ampliamente distribuida en distintas zonas cerebrales, sugiriendo la relación del SRA cerebral con distintas funciones. Entre dichas zonas destaca el hipotálamo (Bunnemann y cols. 1992), de especial importancia en la regulación cardiovascular central.

La renina y el ECA también han sido detectados en el cerebro. La actividad de renina es elevada en hipotálamo, hipófisis y glándula pineal (Speck y cols. 1981), sin embargo los niveles de ARNm son pequeños o incluso indetectables (Iwai y Inagami 1992). Por su parte, el ECA está ubicuamente distribuido en el cerebro, en cantidades especialmente elevadas en las áreas cercanas a la barrera hematoencefálica (Strittmatter y Snyder 1987).

El descubrimiento de inmunoreactividad frente a la Ang II en el cerebro después de una nefrectomía corrobora la regulación independiente del SRA cerebral frente al periférico (Trollet y Phillips 1992). Las zonas cerebrales donde se han detectado mayores niveles de Ang II han sido en el hipotálamo, el sistema límbico y el tronco encefálico (Lind y cols. 1985). En la actualidad, los mecanismos de formación de las distintas angiotensinas con actividad biológica no son del todo conocidos, y aún no se sabe si su procesamiento tiene lugar intra o extracelularmente, por lo que resulta especialmente interesante estudiar las fracciones soluble y unida a membrana de forma independiente. Una primera hipótesis indicaría que el angiotensinógeno es producido por las células de la astrogliá y procesado enzimáticamente hasta las distintas angiotensinas en el espacio extracelular, uniéndose posteriormente a receptores específicos localizados en las neuronas o en la glía. Una segunda hipótesis apoyaría la producción del angiotensinógeno por las células de la glía, su captación por las neuronas y posterior procesamiento intracelular a las formas biológicamente activas, que por último serían liberadas en las terminales nerviosas donde se unirían a sus receptores (Bunnemann y cols. 1992).

A partir de la Ang II se van a formar la Ang III y Ang IV (Baltatu y cols. 1998), moléculas que también presentan actividad biológica. La Ang III cuando se inyecta intracerebroventricularmente se une a los receptores AT1 desencadenando la liberación de vasopresina y el aumento de la presión arterial (Reaux y cols. 1999). La Ang IV en el cerebro se une a los receptores AT4 (Swanson y cols. 1992) localizados

en zonas cerebrales relacionadas con la memoria, el estrés y la orientación espacial (Wright y Harding 1997). La Ang II (1-7) también es formada en el cerebro por una vía enzimática independiente del ECA, y presenta la misma potencia para la liberación de vasopresina que la Ang II (Felix y cols. 1991), aunque no ejerce los mismos efectos dipsógenos ni la misma acción presora central. Parece que la Ang II (1-7) actúa regulando a la Ang II. Como vemos, aunque son varios los péptidos activos que se originan a partir del angiotensinógeno, aún no son del todo conocidas sus vías enzimáticas de formación ni su precisa localización cerebral.

También se han localizado en el cerebro los distintos receptores para las angiotensinas (Allen y cols. 1999). En roedores, el receptor AT1A se ha localizado en áreas cerebrales implicadas en el control de la presión sanguínea y la homeostasis de fluidos. Por su parte, el receptor AT1B se encuentra en tejidos glandulares como la hipófisis anterior y la glándula pineal (Davisson y cols. 2000). Parece que el receptor AT1A estaría más relacionados con las respuestas presoras y el AT1B con el comportamiento dipsógeno. El receptor AT2 se encuentra ampliamente distribuido: septum lateral, varios núcleos talámicos, núcleos subtalámicos, locus ceruleus y oliva inferior (Csikos y cols. 1998). Parece que la unión al receptor AT2 tiene efectos contrarios a los del AT1: inhibe la respuesta dipsógena y la liberación de vasopresina (Hohle y cols. 1995), promueve la diferenciación y regeneración axonal e inhibe la proliferación de células neuronales (Gendron y cols. 1999).

Las angiotensinas actúan sobre neuronas específicas y sobre células neuroendocrinas afectando a la transmisión sináptica y la liberación de hormonas, al tiempo que interfieren con otros sistemas neurotransmisores. Estudios neurofisiológicos han implicado al SRA cerebral en la modulación cardiovascular y en la homeostasis de fluidos y electrolitos mediante su efecto sobre el sistema nervioso autónomo (DiBona 1999), el eje hipotálamo hipofisario y la liberación de vasopresina (Aguilera y Kiss 1996), la sensibilidad a los baroreceptores (Averill y Diz 2000) y la estimulación de la sed (Fitzsimons 1998). Además el SRA tisular está implicado en muchas otras funciones cerebrales como el conocimiento cognitivo, la memoria, la percepción del dolor, el comportamiento sexual y el estrés (Baltatu y cols. 2000), de ahí su importancia funcional.

Varias actividades aminopeptidasas implicadas en la degradación o la biotransformación de las angiotensinas, como la AlaAP, ArgAP, GluAP y AspAP, también han sido identificadas a nivel cerebral (Arechaga y cols., 1996, Prieto y cols., 2000, Ramírez y cols., 1999, Ramírez-Expósito y cols., 2000).

Recientes trabajos, en los que se han utilizado inhibidores específicos de las aminopeptidasas, han demostrado el importante papel que juega la Ang III en la liberación de vasopresina y en la homeostasis de la presión arterial. En estos experimentos los autores observaron que en el cerebro es necesario que la Ang II sea transformada a Ang III por la aminopeptidasa A (actividades GluAP y AspAP) para ejercer un control estimulador tónico sobre la presión arterial y la liberación de vasopresina (Reaux y cols., 1999). En realidad, se sabía que la inyección intracerebroventricular, tanto de la Ang II como Ang III, presentaba los mismos

efectos, y que ambos péptidos muestran una afinidad similar por el receptor AT1. Ya que la AngII es rápidamente metabolizada a AngIII (23 segundos) y ésta a AngIV (8 segundos), no se sabía con certeza cual era realmente el péptido efector en el cerebro. Los estudios de estos autores con inhibidores específicos de la AP A (EC33) y la AP N (PC18) demuestran que el péptido realmente responsable a nivel central de la liberación de vasopresina y el control de la presión arterial es la Ang III (Reaux y cols., 2001), poniendo a su vez de manifiesto el importante papel que juegan en estos procesos las actividades enzimáticas implicadas en la formación de este péptido a partir de la AngII (GluAP y AspAP) y en su transformación a AngIV (AlaAP y ArgAP).

Nuestros resultados demuestran que el tipo de grasa que se ha suministrado a los animales con la dieta afecta a ambas actividades enzimáticas. En concreto, encontramos que un aumento en el grado de saturación de los ácidos grasos incorporados a la dieta tiende a incrementar las actividades AlaAP y ArgAP (AP N) en la fracción de membrana, tanto de la corteza cerebral como del hipotálamo. Este efecto podría relacionarse con una mayor actividad degradativa sobre la Ang III. Por otro lado, También son destacables los menores niveles de actividad GluAP en hipotálamo y AspAP en corteza frontal consecuentes al consumo de aceite de girasol o manteca de cerdo, lo que podría afectar a la biotransformación de la AngII en AngIII. En conjunto, podríamos afirmar que, a nivel cerebral, el tipo de grasa consumida puede afectar a las aminopeptidasas que transforman las distintas angiotensinas, lo que podría traducirse en una distinta proporción entre estos péptidos, pudiendo afectar a largo plazo no sólo al control central de la presión arterial y el balance hidroelectrolítico, sino también a muchas otras funciones como la memoria, el comportamiento sexual y la respuesta frente al estrés.

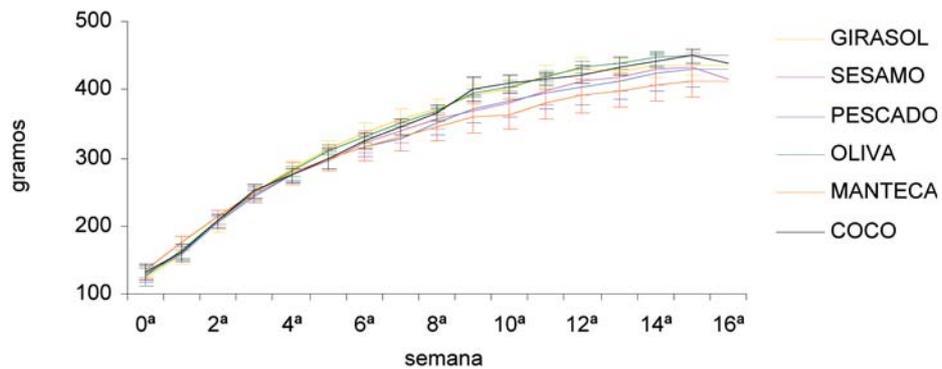
Otra de las actividades por nosotros estudiada, la actividad pGluAP, se ha descrito en su forma unida a membrana (piroglutamil aminopeptidasa II) como una actividad hidrolítica específica sobre la hormona liberadora de la tirotrópina (TSH), aunque se sabe que esta actividad representa a otras enzimas solubles y unidas a membrana que hidrolizan otros péptidos como la GnRH, la neurotensina o la bombesina (Cummins y O'Connor, 1996). Dichos neuropéptidos actúan como neurotransmisores o neuromoduladores en una gran variedad de funciones centrales. En hipotálamo encontramos menores niveles de esta actividad con el aceite de girasol, aceite de oliva y manteca de cerdo en la fracción soluble ($p < 0,001$), diferencia que sólo se mantiene para el aceite de oliva frente al aceite de sésamo y el de coco para la fracción unida a membrana ($p < 0,05$) (Tabla 23-Gráfica 28). En la corteza frontal la actividad pGluAP sol sigue siendo inferior para el aceite de girasol y la manteca de cerdo ($p < 0,001$) (Tabla 22-Gráfica 27), efecto que también se manifiesta en la fracción unida a membrana ($p < 0,05$).

Por último, la actividad CysAP ha demostrado tener como sustratos a la oxitocina y la vasopresina. El procesamiento de este último péptido por las aminopeptidasas en el cerebro origina la acumulación de varios metabolitos, entre otros los (pGlu4, Cyt6) VP 4-9 y 4-8, que muestran efectos sobre el comportamiento semejantes a

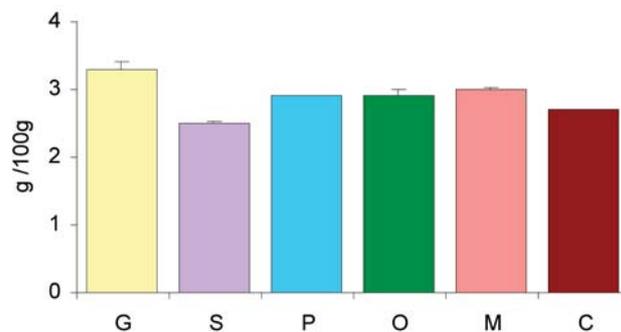
los de la vasopresina, aunque de forma más potente y selectiva (Burbach y cols. 1998). Los efectos del tipo de grasa dietética sobre la actividad CysAP se manifiestan fundamentalmente en el hipotálamo donde a nivel soluble el aumento en el grado de saturación claramente tiende a disminuir la actividad ($p < 0,001$), mientras que la fracción unida a membrana disminuye sólo con el consumo de aceite de girasol ($p < 0,001$) (Tabla 23-Gráfica 28).

5. GRAFICAS

Pesos Semanales

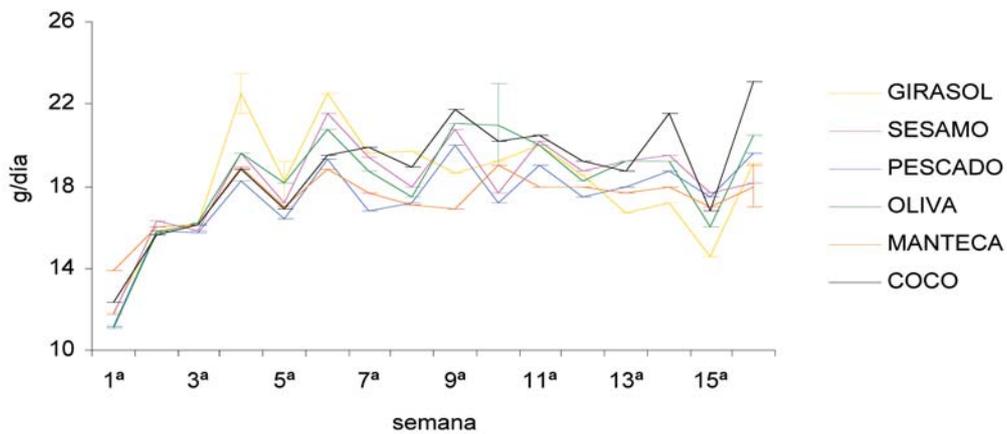
ANOVA $p > 0,05$

Peso Hígado

ANOVA $p < 0,01$ **
TEST TUKEY:
G-S

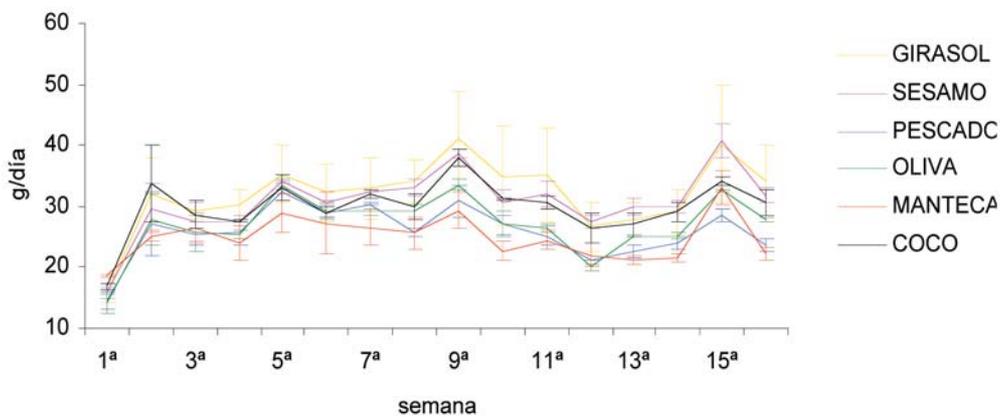
GRÁFICAS 1 y 2. Valores medios \pm el error estándar de los pesos corporales de cada grupo de ratas a lo largo del periodo experimental (expresados en gramos), y de los pesos de los hígados tras el sacrificio (expresados en gramos de hígado / 100 gramos de peso corporal). En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Ingesta de Alimento



ANOVA	4ªS: $p < 0,05$ *	16ª S: $p < 0,01$ **
TEST TUKEY:	G-P	S-C G-C P-C M-C

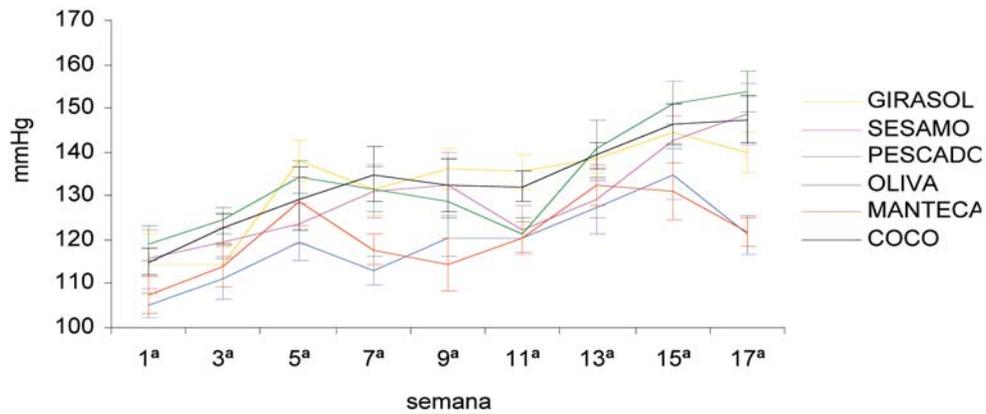
Ingesta de Agua



ANOVA	13ªS: $p < 0,05$ *
TEST TUKEY:	S-M

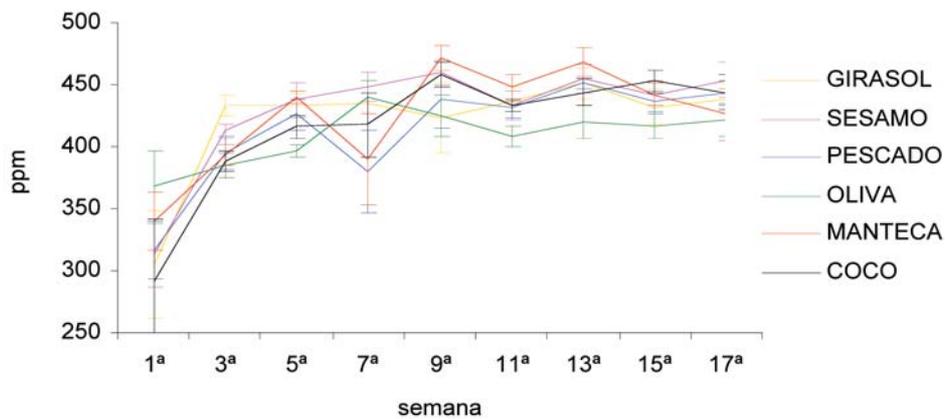
GRÁFICAS 3 y 4. Valores medios \pm el error estándar de los niveles de ingesta de alimento y de agua (expresados en gramos/día) a lo largo del periodo experimental. En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Presión Arterial



ANOVA	7ª S: p<0,05*	11ª S: p<0,05 *	17ª S: p<0,001 ***
TEST TUKEY:	P-C	G-P G-M	P-S M-S P-O M-O P-C M-C

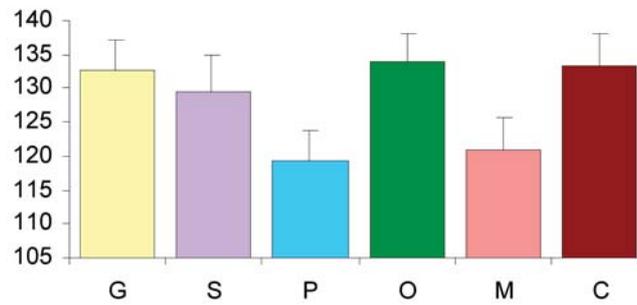
Frecuencia Cardiaca



ANOVA	3ª S: p<0,01 **	5ª S: p<0,05 *
TEST TUKEY:	G-O G-M G-C	M-O

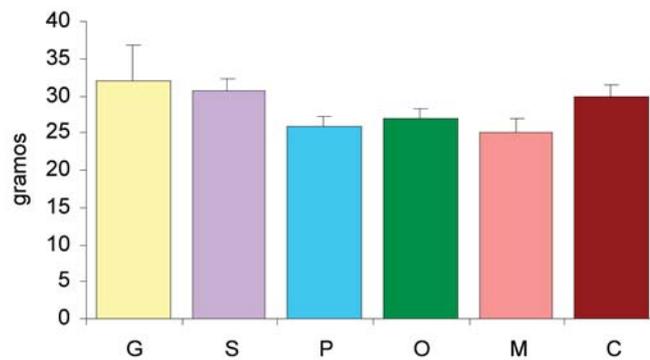
GRÁFICAS 5 y 6. Valores medios \pm el error estándar de los niveles de presión arterial sistólica (expresados en mmHg) y de frecuencia cardiaca (expresados en ppm) a lo largo del periodo experimental. En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Presión Arterial Media



ANOVA	p<0,01 **
TEST TUKEY:	
P-G	
P-O	
P-C	

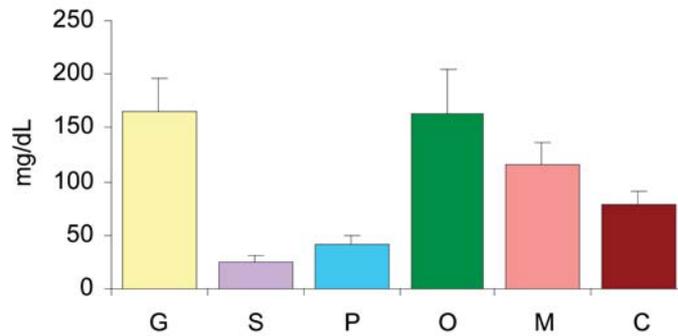
Ingesta media de agua



ANOVA	p< 0,001***
TEST TUKEY:	
S-M	
G-P	
G-O	
G-M	

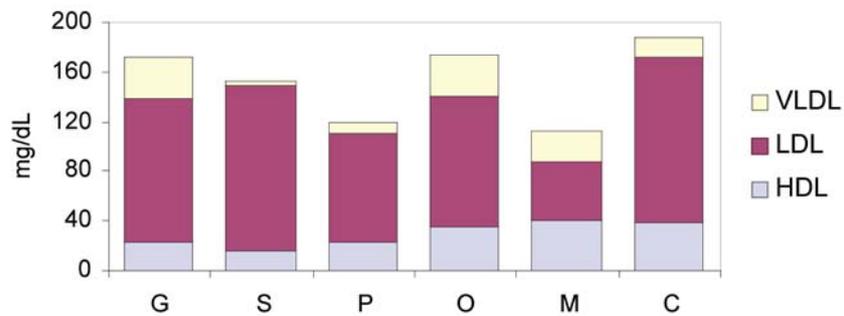
GRÁFICAS 7 y 8. Valores medios \pm el error estándar de los valores semanales de presión arterial sistólica (mmHg) y de ingesta de agua (mg). En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Trigliceridos



ANOVA	p<0,001 ***
TEST TUKEY:	
S-G	
S-O	
P-G	
P-O	

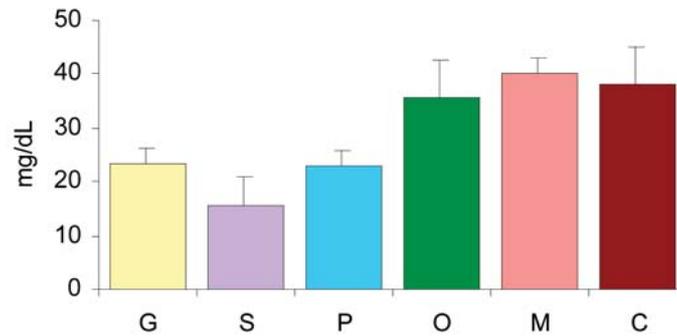
Colesterol Total



ANOVA	p<0,001 ***
TEST TUKEY:	
P-G	M-G
P-O	M-O
P-C	M-C

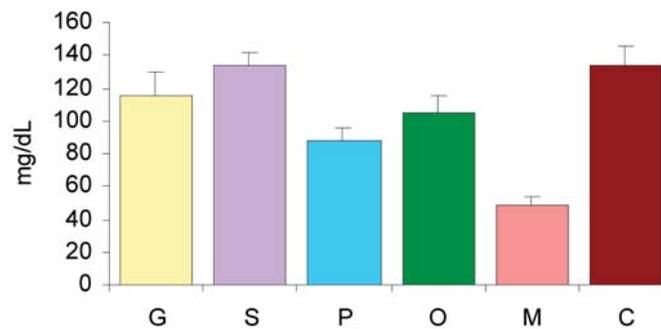
GRÁFICAS 9 y 10. Valores medios \pm el error estándar de los niveles de triglicéridos y del colesterol unido a las distintas fracciones lipoproteicas, expresados en mg/dL. En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

CHO-HDL



ANOVA	p<0,01 **
TEST TUKEY:	
S-M	
S-C	

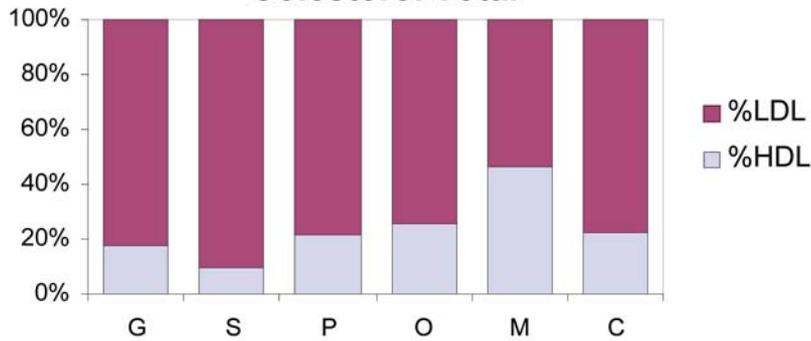
CHO-LDL



ANOVA	p<0,001 ***
TEST TUKEY:	
M-S	P-C
M-G	
M-O	
M-C	

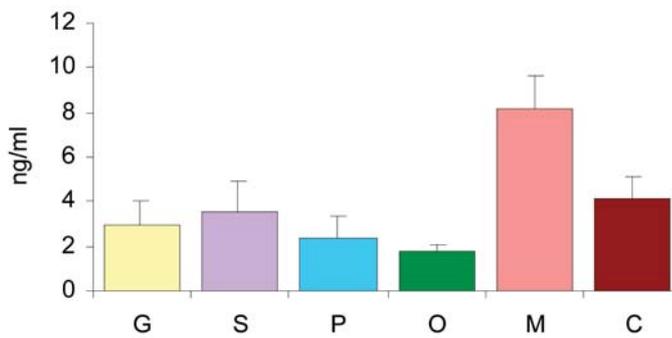
GRÁFICAS 11 y 12. Valores medios \pm el error estándar de los niveles de colesterol unido a lipoproteínas HDL y a lipoproteínas LDL. En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

% de CHO-HDL y CHO-LDL respecto al Colesterol Total



% CHO-LDL / CHO-T		% CHO-HDL / CHO-T	
ANOVA	p<0,001 ***	ANOVA	p<0,001 ***
TEST TUKEY:		TEST TUKEY:	
S-G	M-G	M-G	
S-P	M-P	M-S	
S-O	M-O	M-P	
S-M	M-C	M-O	
S-C		M-C	

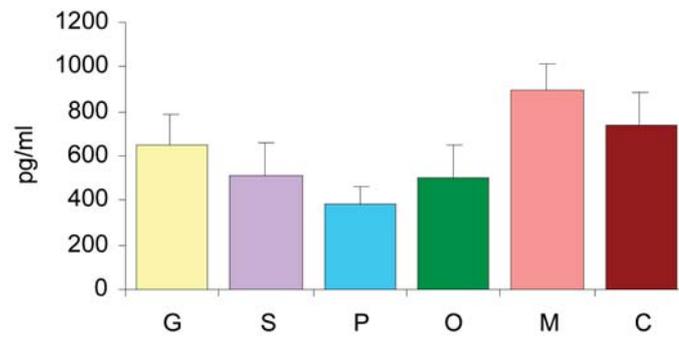
Testosterona



ANOVA	p<0,01 **
TEST TUKEY:	
M-G	
M-S	
M-P	
M-O	

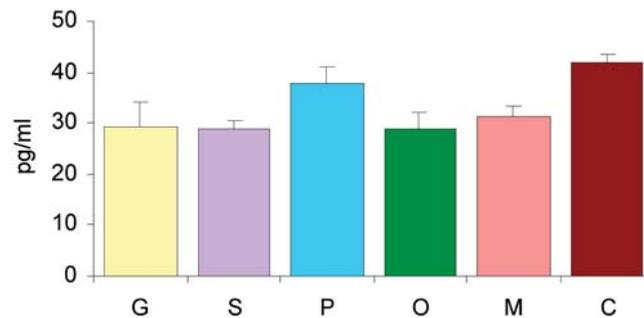
GRÁFICAS 13 y 14. Valores medios ± el error estándar de los niveles de colesterol unido a HDL y a LDL expresado en porcentaje respecto al colesterol total y niveles de testosterona (ng/ml) determinados en plasma. En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Dihidrotestosterona



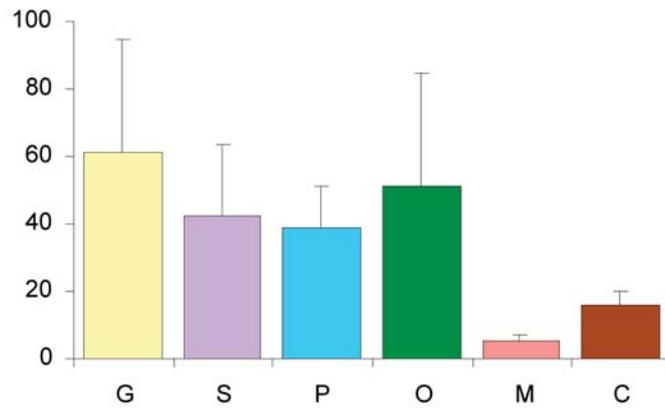
ANOVA	p>0,05
-------	--------

Estradiol

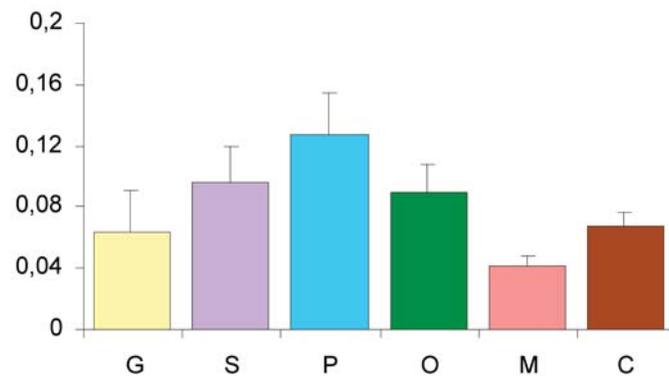


ANOVA	p<0,05*
TEST TUKEY:	
O-C	

GRÁFICAS 15 y 16. Valores medios \pm el error estándar de los niveles de dihidrotestosterona y estradiol (pg/ml) determinados en plasma. En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

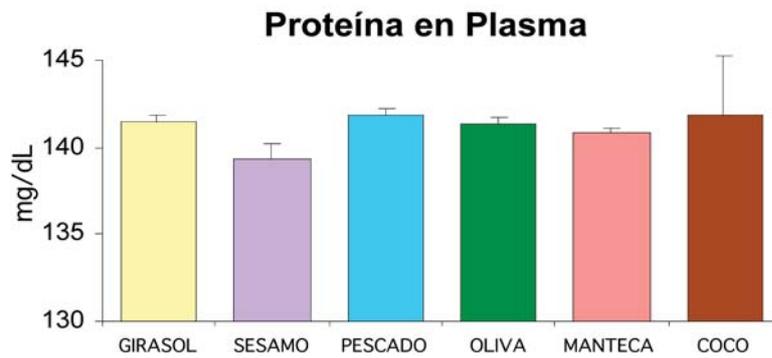
Estradiol/Testosterona

ANOVA	$p > 0,05$

Estradiol/Dihidrotestosterona

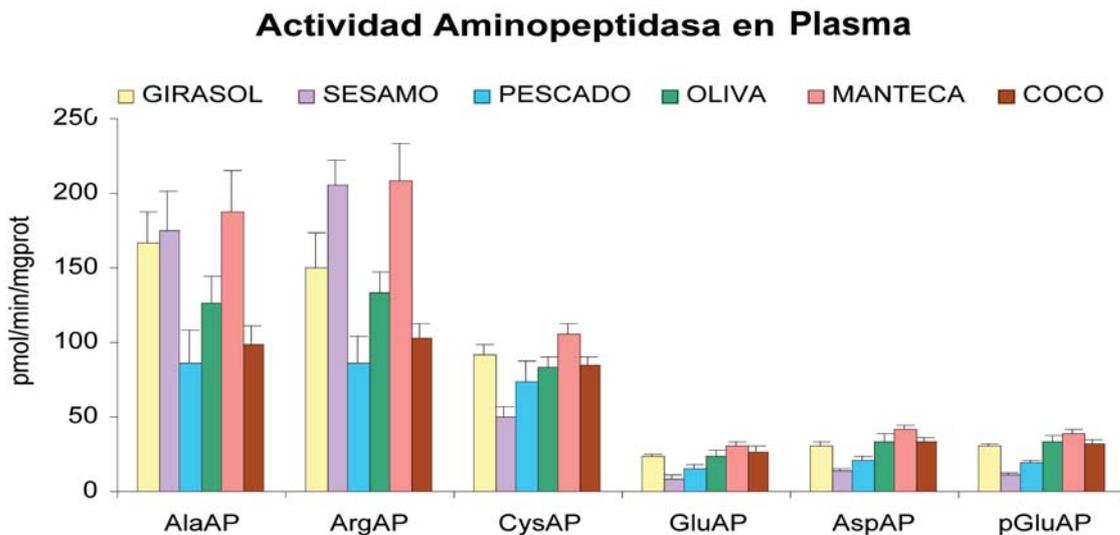
ANOVA	$p > 0,05$

GRÁFICAS 17 y 18. Valores medios \pm el error estándar de los cocientes estradiol/testosterona y estradiol/dihidrotestosterona (pg/ml). En la tabla se representan las diferencias estadísticamente significativas y entre qué grupos se establecen; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.



ANOVA	p<0,05 *
TEST TUKEY:	
S-G	S-O
S-P	S-C

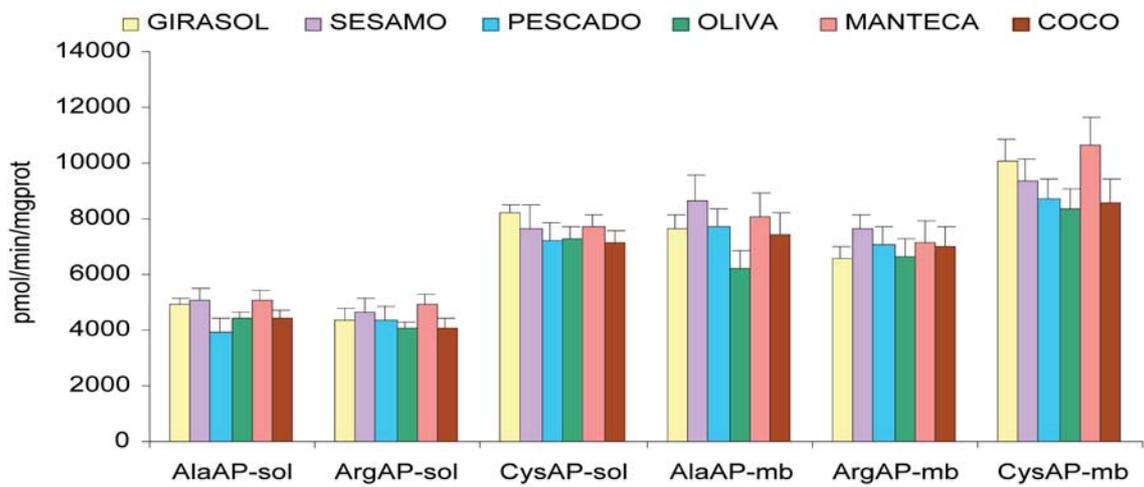
GRÁFICA 19. Valores medios del contenido de proteínas en plasma (mg/dL), determinados mediante la técnica de Bradford (1976). *p< 0,05.

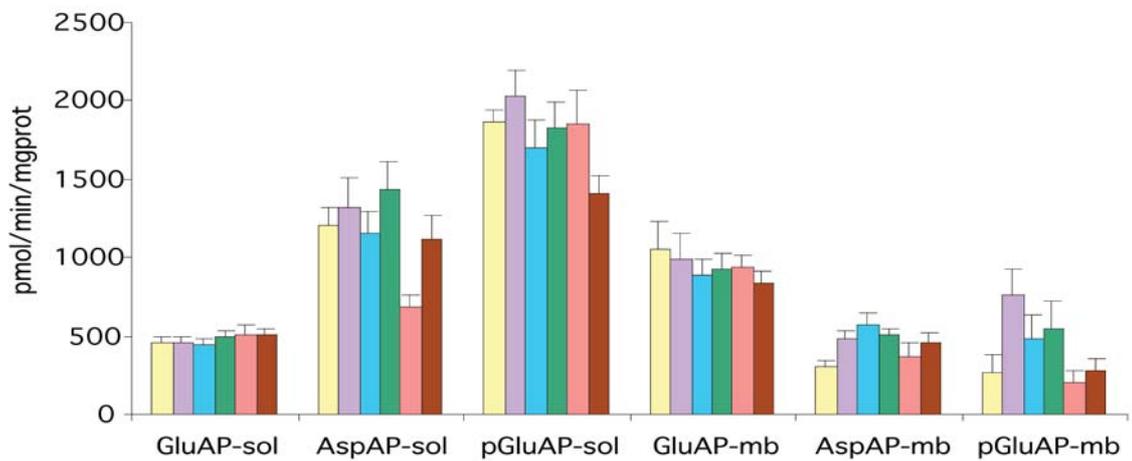


**	***	**	***	***	***
P-M	S-P S-C M-P M-C	S-G S-M	S-G S-O S-M S-C P-M	S-G S-O S-M S-C P-O P-M	S-G S-O S-M S-C P-O P-M

GRÁFICA 20. Niveles medios ± el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP en plasma, expresados como pmol del Aa-β-NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Actividad Aminopeptidasa en Corteza Renal

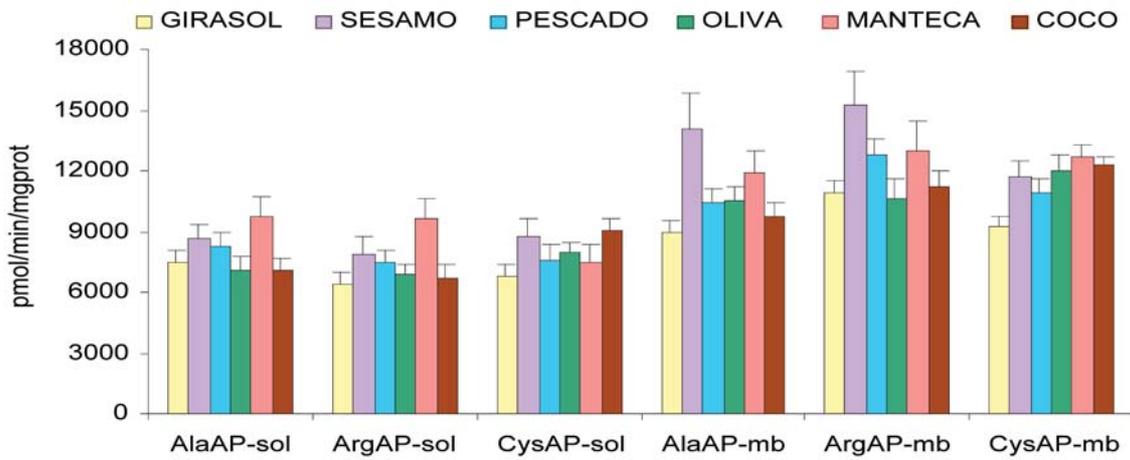




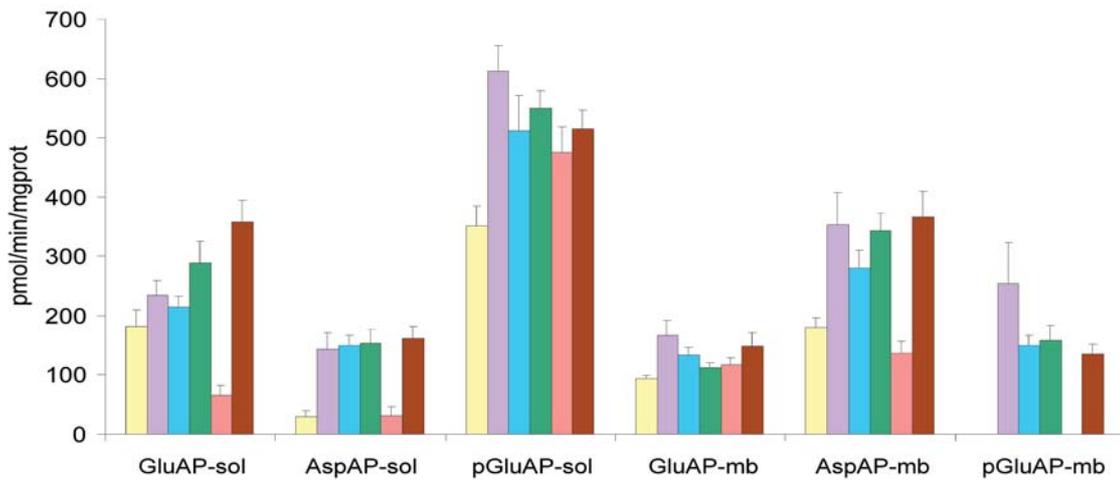
	*			*	
	O-M			G-P	

GRÁFICA 21. Niveles medios \pm el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en corteza renal, expresados como pmol del Aa- β -NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Actividad Aminopeptidasa en Médula Renal



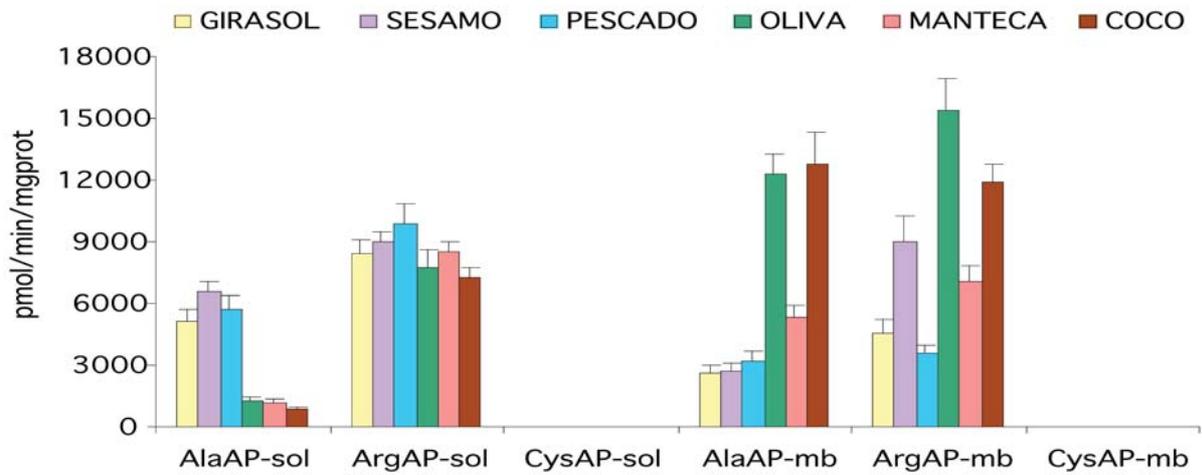
	*		*		**
	G-M		S-G		G-M G-C



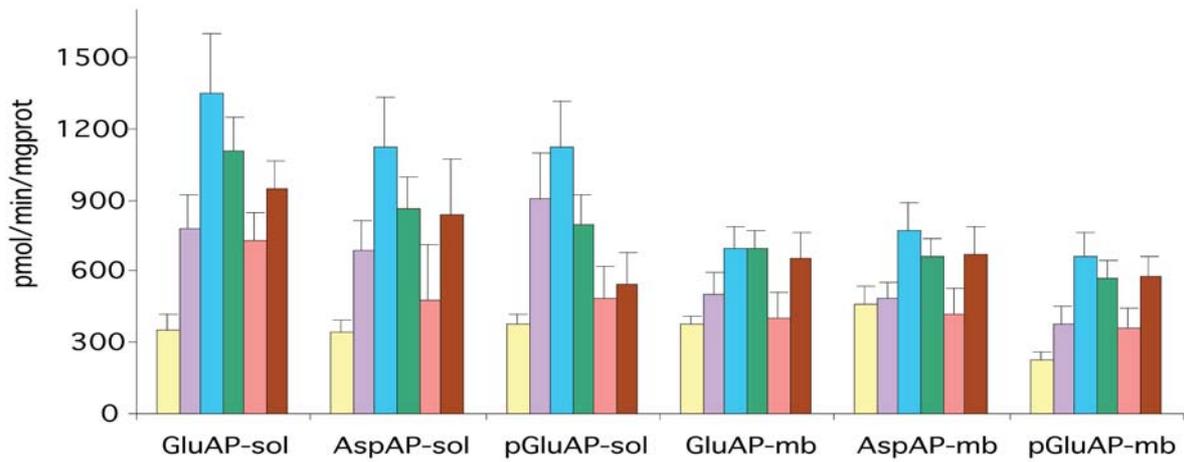
***	**	**	*	***	
S-M P-M O-M S-C G-C P-C M-C	G-S G-P G-O G-C	G-S G-O	G-S	S-G S-M G-O G-C O-M M-C	

GRÁFICA 22. Niveles medios \pm el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en médula renal, expresados como pmol del Aa- β -NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Actividad Aminopeptidasa en Cayado Aórtico



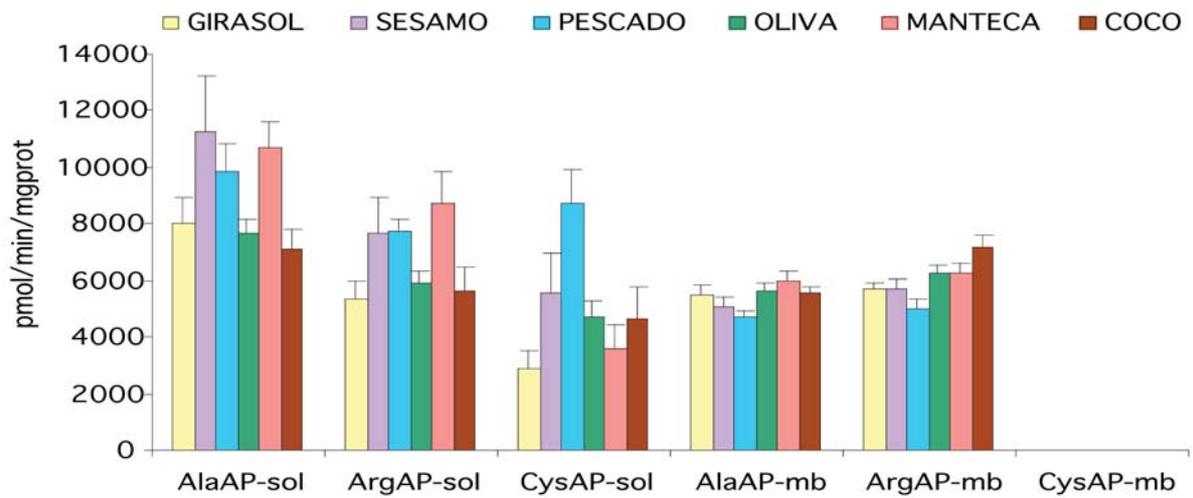
***			**	***	
S-O			S-O	S-G	
S-M			S-C	S-P	
S-C			G-O	S-O	
G-O			G-C	G-O	
G-M			P-O	G-C	
G-C			P-C	P-O	
P-O			O-M	P-C	
P-M			M-C	O-M	
P-C				M-C	



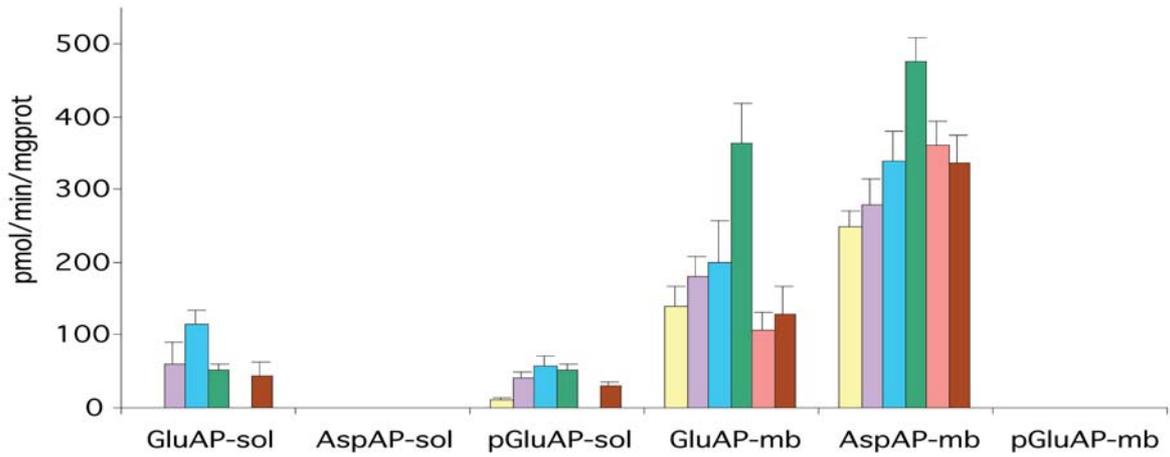
**	**	**	**	*	***
G-P	G-P	G-P	G-O	P-M	G-P
G-O	P-M	P-M			G-O
					G-C
					P-M

GRÁFICA 23. Niveles medios \pm el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en cayado aórtico, expresados como pmol del Aa- β -NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Actividad Aminopeptidasa en Aurícula



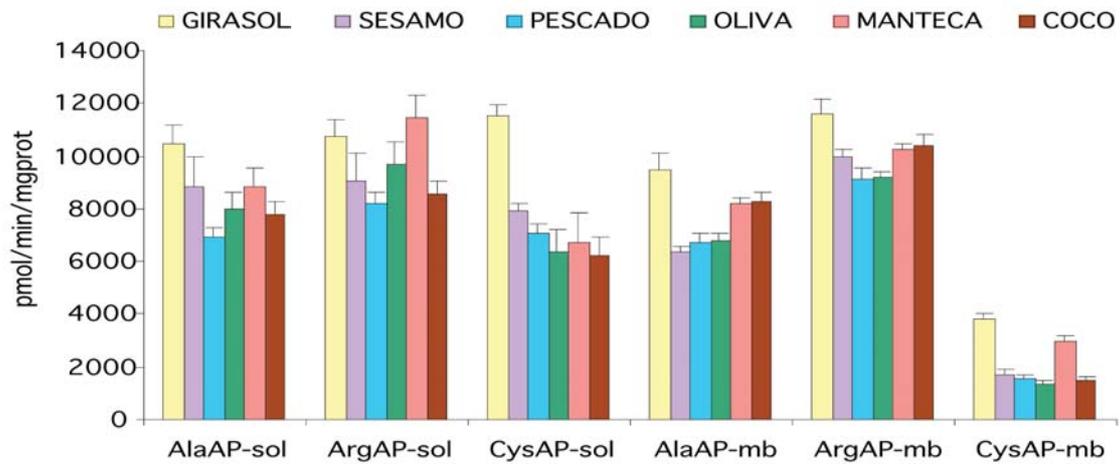
*	*	**	*	***	
S-C	G-M	G-P M-P	P-M	S-C G-C P-C	



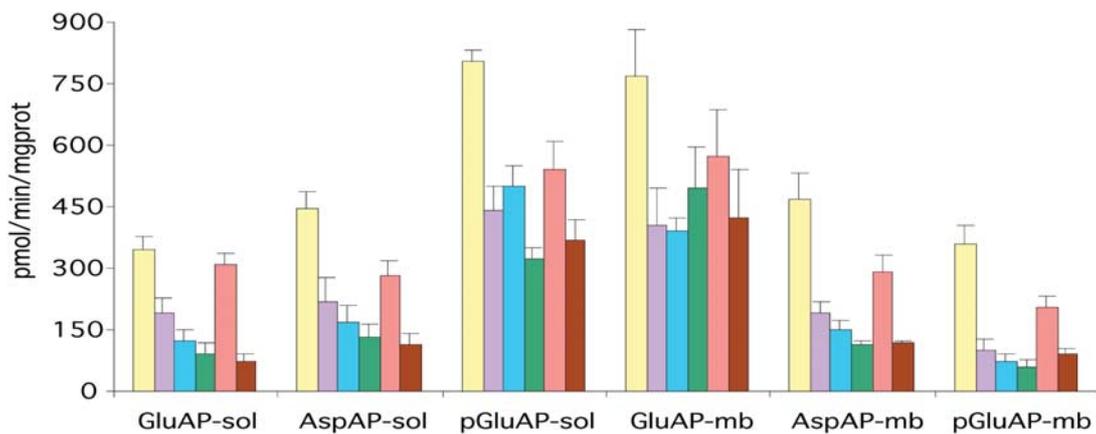
*		*	***	***	
P-C		G-P	S-O G-O M-O C-O	O-S O-G	

GRÁFICA 24. Niveles medios \pm el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en aurícula, expresados como pmol del Aa- β -NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Actividad Aminopeptidasa en Ventrículo



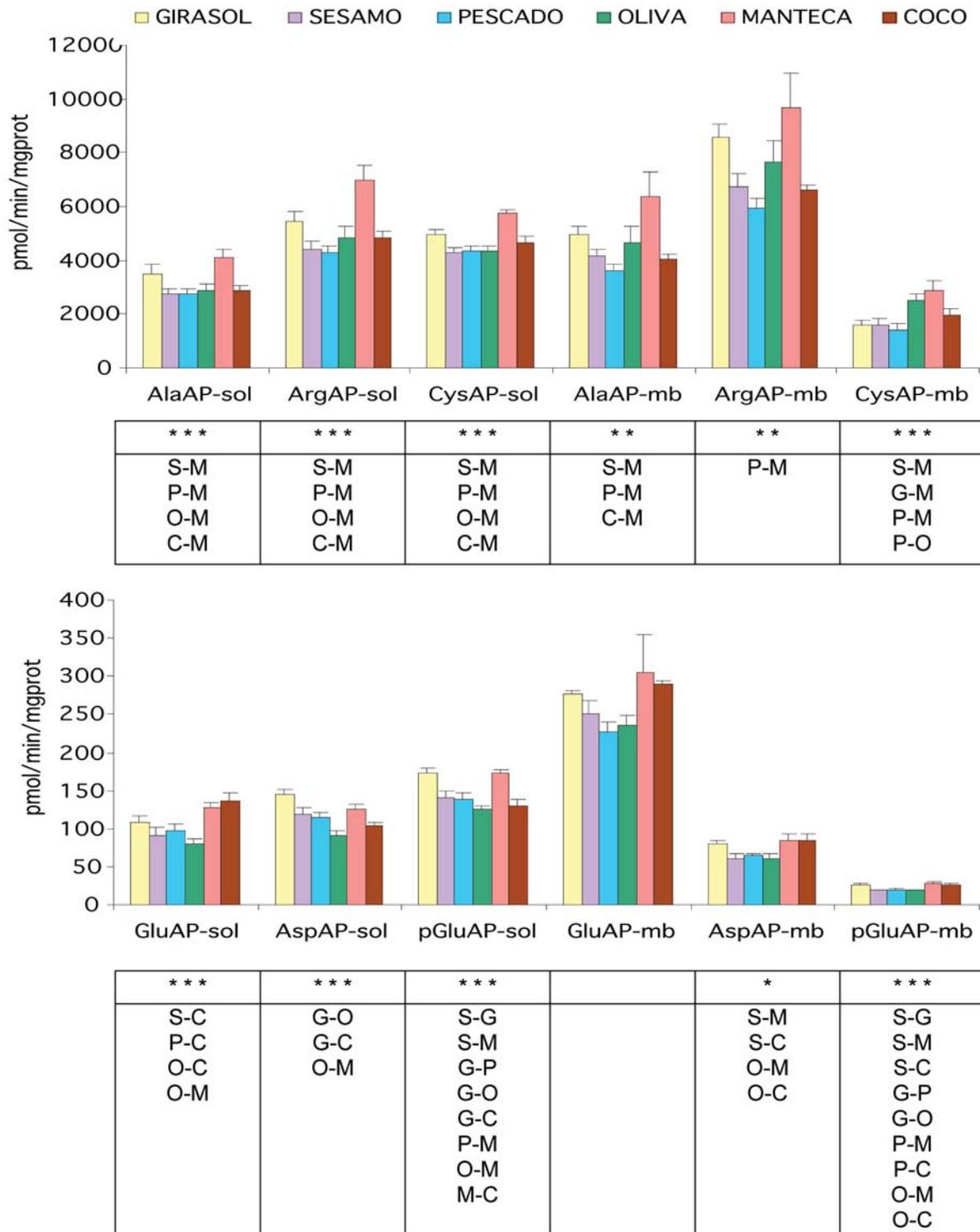
*	*	***	***	***	***
G-P	P-M	S-G G-P G-O G-M G-C	S-G S-M S-C G-P G-O	S-G G-P G-O	S-G S-M G-P G-O G-M G-C P-M O-M M-C



***	***	***		***	***
S-G G-P G-O G-C P-M O-M M-C	S-G G-P G-O G-C	S-G G-P G-O G-M G-C O-M		S-G G-P G-O G-M G-C O-M M-C	S-G G-P G-O G-M G-C P-M O-M

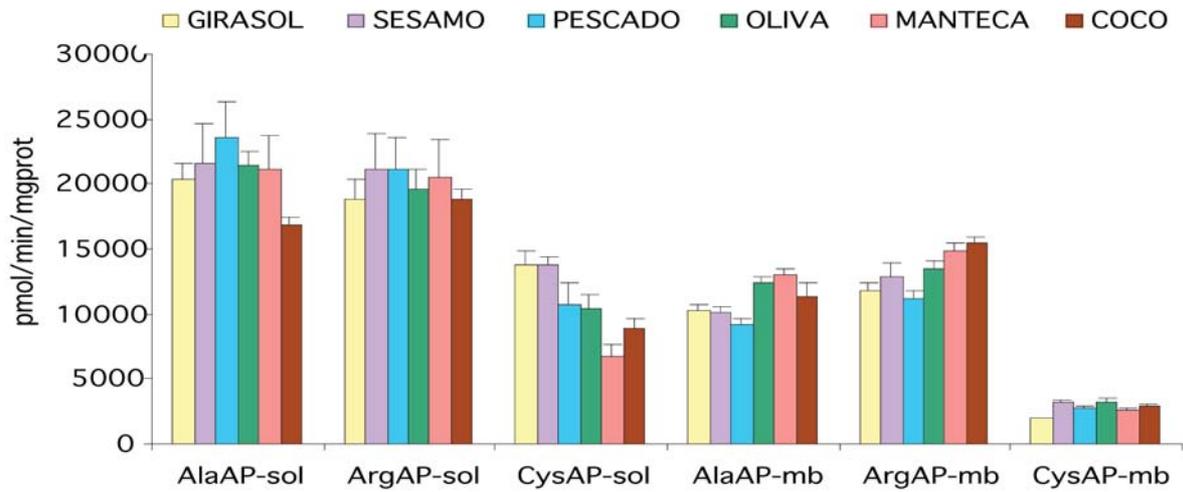
GRÁFICA 25. Niveles medios ± el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en ventrículo, expresados como pmol del Aa-β-NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Actividad Aminopeptidasa en Testiculo

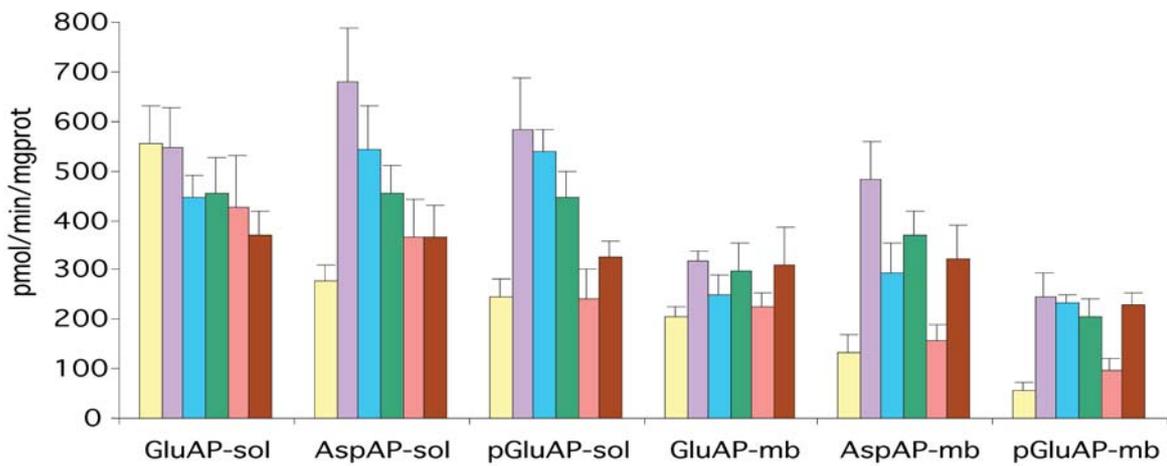


GRÁFICA 26. Niveles medios ± el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en testículo, expresados como pmol del Aa-β-NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Actividad Aminopetidasa en Corteza Frontal



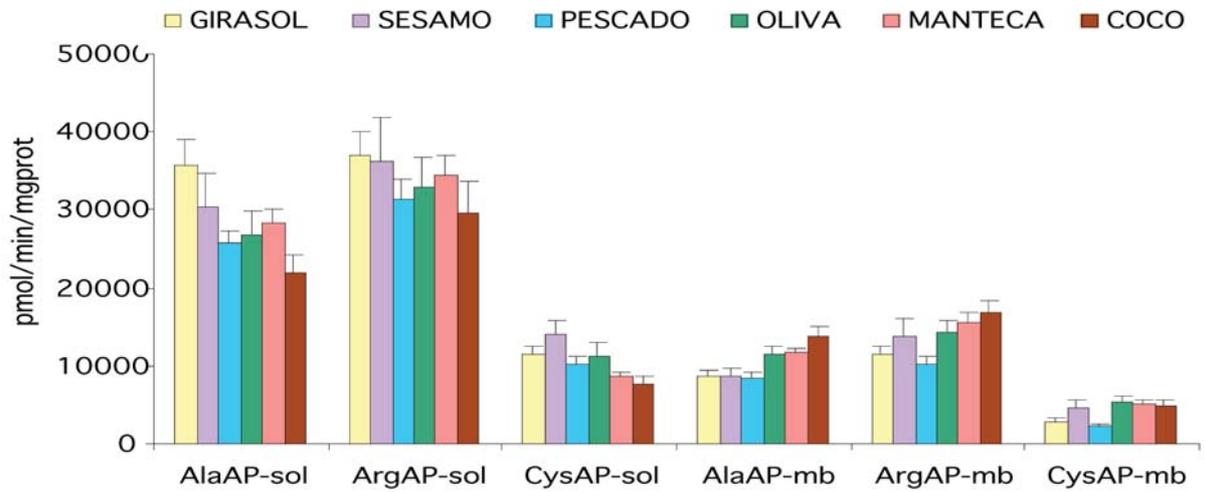
		***	***	***	***
		S-M S-C G-M G-C	S-M G-M P-O P-M	G-M G-C P-M P-C	G-S G-O G-C



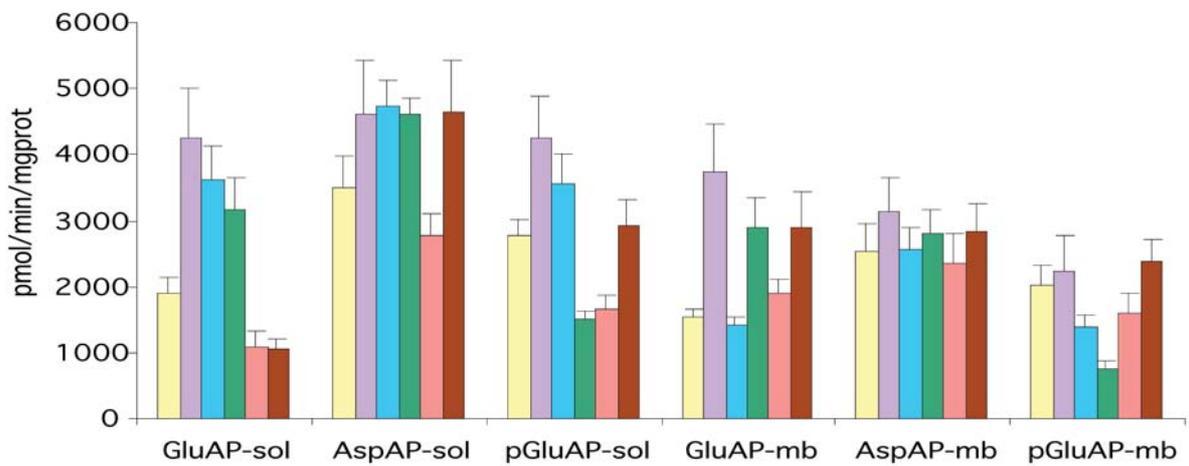
	**	***		***	*
	S-G	S-G S-M S-C G-P P-M		S-G S-M G-O	S-G

GRÁFICA 27. Niveles medios \pm el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en corteza frontal, expresados como pmol del Aa- β -NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Actividad Aminopeptidasa en Hipotalamo



*		*	***	*	**
G-C		S-C	S-C G-C P-C	P-C	P-O P-M



***		***	**		*
S-G S-M S-C P-M P-C O-M O-C		S-O S-M P-O P-M	S-G S-P S-M		S-O O-C

GRÁFICA 28. Niveles medios ± el error estándar de actividad AlaAP, ArgAP, CysAP, GluAP, AspAP y pGluAP soluble y unida a membrana en hipotálamo, expresados como pmol del Aa-β-NA correspondiente, hidrolizados por min y por mg de proteína. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

VI. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. No existen diferencias en los valores medios de **peso corporal** de los distintos grupos de animales durante todo el periodo experimental, ni en los valores de peso corporal alcanzados en el momento del sacrificio. Tampoco se establecieron diferencias significativas entre los valores de **ingesta media de alimento** para los distintos grupos animales considerados, con excepción de la cuarta semana experimental, donde la ingesta fue algo superior para el grupo de girasol y para la semana décimo sexta, donde la ingesta fue superior para el grupo que consumía aceite de coco. Los valores de **ingesta de agua** fueron menores para los animales a los que se les suministró el aceite de pescado y la manteca de cerdo.
2. En los valores de **presión arterial**, para cada uno de los grupos de animales, existen diferencias en la séptima semana del periodo de alimentación donde ya aparecen valores de presión arterial inferiores para los grupos alimentados con aceite de pescado y con manteca de cerdo, diferencia que vuelve a manifestarse en las semanas décimo primera y décimo séptima; y que se mantiene cuando consideramos los valores medios obtenidos para cada grupo durante todo el periodo experimental. También se establecieron correlaciones positivas entre los valores medios de presión arterial final y niveles totales de colesterol en plasma y de colesterol LDL, en el grupo de animales alimentados con aceite de girasol. En cuanto a la **frecuencia cardiaca**, se observan frecuencias superiores para el aceite de girasol frente al aceite de oliva, el coco y la manteca de cerdo en la tercera semana y para la manteca de cerdo frente al aceite de oliva en la quinta semana; sin que al final del periodo experimental se lleguen a establecer diferencias significativas entre los grupos de animales que consumieron las distintas dietas.
3. Nuestros resultados demuestran que los niveles de **colesterol total** son mayores cuando se utilizan sésamo, girasol, oliva y coco que cuando se utilizan aceite de pescado o grasa de cerdo. Los niveles de **HDL-colesterol** son mayores al utilizar oliva, grasa de cerdo y coco que al utilizar sésamo, girasol o pescado. Los niveles de **LDL-colesterol** son menores al utilizar grasa de cerdo, en comparación con el resto de aceites entre los que no hay grandes diferencias. Los niveles de **triglicéridos** son muy bajos cuando se utilizan sésamo y pescado y altos cuando se utilizan oliva y girasol. Nuestros resultados demuestran un incremento de los niveles de **testosterona** cuando se utiliza grasa de cerdo en

la dieta con respecto al resto de aceites utilizados. Los menores niveles de testosterona se obtuvieron cuando se utilizó aceite de oliva en la dieta, pero no existen diferencias entre ésta dieta y las que contenían aceites de sésamo, girasol, pescado o coco. No se observan diferencias entre grupos en los niveles de **dihidrotestosterona**. Finalmente, los niveles de **estradiol** muestran escasas diferencias entre los diferentes grupos de aceites utilizados. Sin embargo, las diferencias alcanzan significación estadística cuando comparamos el uso de coco con oliva; siendo la actividad mayor con el uso de aceite de coco.

4. En **plasma**, las actividades AlaAP y ArgAP, muestran un patrón de comportamiento muy similar, con valores mínimos en los animales alimentados con aceite de pescado en comparación con la manteca de cerdo en el caso de la AlaAP y con la manteca de cerdo y el sésamo en el caso de la ArgAP, donde también se establecen diferencias entre el aceite de coco frente al sésamo y la manteca de cerdo. Las actividades GluAP y AspAP presentan también entre ellas un patrón muy similar, donde destacan los valores significativamente mayores para el aceite de girasol, mientras que el resto de las grasas parecen tender al aumento de estas actividades enzimáticas de manera proporcional a su grado de saturación. Niveles y comportamiento similar encontramos para la pGluAP y la CysAP.
5. En la **corteza renal** encontramos que la manteca parece determinar menores niveles de AspAP frente al aceite de oliva en la fracción soluble, mientras que en la fracción unida a membrana se obtuvieron niveles significativamente menores para el girasol cuando se compara con el pescado. En la **médula renal** la actividad ArgAP soluble fue superior para la manteca, y en la fracción unida a membrana encontramos los mayores niveles de AlaAP tras el consumo de sésamo, y el girasol determina los menores niveles de actividad CysAP cuando se compara con las dos grasas saturadas, manteca y coco. No obstante, las variaciones más significativas se localizaron en la médula renal para las actividades GluAP, AspAP y pGluAP. La actividad GluAP soluble aparece inferior en los animales que consumieron manteca de cerdo que en los que consumieron el resto de las grasas. En la fracción de membrana sólo encontramos diferencias entre el sésamo y el girasol. La actividad AspAP soluble y unida a membrana muestra también los menores niveles de actividad con girasol y manteca de cerdo. Por último, la actividad pGluAP en la fracción soluble presenta una actividad menor con el girasol.
6. En la **aorta**, la actividad AlaAP soluble presenta mayores niveles de actividad con el sésamo, girasol y pescado frente al aceite de oliva, coco y manteca de cerdo. Sin embargo, en la fracción de membrana el patrón parece invertirse, alcanzándose las mayores actividades con el aceite de oliva y el coco. La actividad ArgAP soluble no muestra diferencias, y la de membrana parece comportarse de forma similar a la AlaAP, con excepción del aceite de sésamo. La actividad GluAP soluble es menor en los animales alimentados con aceite de girasol frente al pescado y el aceite de oliva, y lo mismo ocurre en la fracción de membrana,

aunque en éste caso la diferencia sólo se mantiene frente a la grasa monoinsaturada. Patrones muy similares encontramos para la actividad AspAP soluble y unida a membrana. La actividad pGluAP soluble muestra sus menores niveles con el aceite de girasol y las grasas saturadas. La fracción unida a membrana parece seguir un patrón similar.

7. En **aurícula**, la actividad ArgAP de membrana muestra niveles mayores con el aceite de coco frente a las grasas más insaturadas (sésamo, girasol y pescado); la actividad GluAP de membrana muestra mayores niveles con el aceite de oliva en comparación con el sésamo, girasol, manteca y coco; y la actividad AspAP unida a membrana sigue un patrón similar al de la GluAP, aunque en este caso las diferencias se establecen sólo frente al sésamo y al girasol. En el **ventrículo** la actividad AlaAP y ArgAP de membrana muestran sus niveles más elevados con el aceite de girasol frente al sésamo, pescado y oliva. La actividad GluAP soluble aparece superior con el aceite de girasol y la manteca de cerdo, al igual que ocurre con las actividades AspAP tanto solubles como de membrana. La CysAP soluble presentó mayor actividad en los animales que consumieron el aceite de girasol en comparación con los que ingirieron el resto de grasas, diferencia que se mantuvo frente al sésamo, el pescado, el aceite de oliva y la manteca de coco en la fracción de membrana. La actividad pGluAP fue superior tras el consumo de girasol tanto en la fracción soluble como en la unida a membrana.
8. En **testículo**, las actividades de AlaAP, ArgAP, CysAP, AspAP, pGluAP solubles y AlaAP y ArgAP unidas a membrana muestran sus mayores niveles con el uso de manteca y girasol en la dieta y los menores con el resto de aceites. Por otro lado, GluAP soluble y GluAP, AspAP y pGluAP unidas a membrana, muestran sus mayores niveles de actividad con girasol, manteca y coco y finalmente, los mayores niveles de actividad para CysAP unida a membrana se obtuvieron con manteca y oliva. En términos generales, girasol y manteca, y en algunos casos también coco, incrementan Los niveles de actividad aminopeptidásica mientras que sésamo, pescado y oliva (excepto en el caso de CysAP unida a membrana para oliva) los reducen.
9. En la **corteza frontal**, excepto para las actividades AspAP y pGluAP solubles, que tuvieron menores valores con el aceite de girasol, parece existir una tendencia general a que las actividades solubles disminuyan con el grado de saturación de la grasa dietética. En la fracción unida a membrana el comportamiento es distinto: las actividades AlaAP y ArgAP muestran sus mayores niveles con las grasas más saturadas, mientras que el resto de las actividades siguen un patrón heterogéneo, con niveles generalmente inferiores para el aceite de girasol y la manteca de cerdo. En el **hipotálamo**, las actividades AlaAP, ArgAP y CysAP, tanto solubles como unidas a membrana, presentaron un comportamiento similar al descrito para la corteza frontal. El comportamiento del resto de las actividades parecía no adaptarse a un patrón claro. En hipotálamo encontramos menores niveles de pGluAP con el aceite de girasol, aceite de oliva y manteca de cerdo en la fracción soluble, diferencia que sólo se mantiene

para el aceite de oliva frente al aceite de sésamo y el de coco para la fracción unida a membrana. En la corteza frontal la actividad pGluAP sol sigue siendo inferior para el aceite de girasol y la manteca de cerdo, efecto que también se manifiesta en la fracción unida a membrana. Los efectos del tipo de grasa dietética sobre la actividad CysAP se manifiestan fundamentalmente en el hipotálamo donde a nivel soluble, el aumento en el grado de saturación claramente tiende a disminuir la actividad, mientras que la fracción unida a membrana disminuye sólo con el consumo de aceite de girasol.

VII. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- AALKJAER C., EISKJAER H., MULVANY MJ., JESPERSEN B., KJAER T., SORENSEN SS., & PEDERSEN EB. 1989. Abnormal structure and function of isolated subcutaneous resistance vessels from essential hypertensive patients despite antihypertensive treatment. *J Hypertens* 7: 305-310.
- ABAYASEKARA DR. & WATHES DC. 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 61:275-87.
- ABDELRAHMAN AM., BURRELL LM. & JOHNSTON CI. 1993. Blockade of the renin-angiotensin system at different sites: effect on renin, angiotensin and aldosterone. *J Hypertens*, 11 (Suppl 3): S23-S26.
- ABHOLD RH. & HARDING JW. 1988. Metabolism of angiotensin II and III by membrane-bound peptidases from rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, 245: 171-177.
- ADAM O., WOLFRAM G. & ZOLLNER N. 1986. Effect of alpha-linolenic acid in the human diet on linoleic acid metabolism and prostaglandin biosynthesis. *J Lipid Res* 27(4):421-6.
- ADASHI EY. & HSUEH AJ. 1981. Direct inhibition of testicular androgen biosynthesis by arginine-vasopressin: mediation through pressor-selective testicular recognition sites. *Endocrinology* 109:1793-1795.
- AGUILERA G. & KISS A. 1996. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and vasopressin secretion. Role of angiotensin II. *Adv Exp Med Biol* 396:105-112.
- AHAMD S. & WARD PE. 1990. Role of aminopeptidase activity and regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther*, 252:643-650.
- ALBA F., IRIBAR C., RAMÍREZ M. & ARENAS C. 1989. Un método fluorimétrico para la determinación de aminopeptidasas cerebrales. *Arch de Neurobiol* 52: 169-173.
- ALBA F., ARENAS JC. & LOPEZ MA. 1995. Comparison of soluble and membrane-bound pyroglutamyl peptidase I activities in rat brain tissues in the presence of detergents. *Neuropeptides* 29, 103-107.

- ALBERT CM., HENNECKENS CH. & O´DONNELI CJ. 1998. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *J Am Med Assoc* 279: 23-28.
- ALBERT Z. & SZEWZUK A. 1972. Pyrrolidonyl peptidase in some avian and rodent tissues: histochemical localization and biochemical studies. *Acta Histochem* 44: 98-105.
- ALBISTON AL., MCDOWALL SG., MATSACOS D., SIM P., CLUNE E., MUSTAFA T., LEE J., MENDELSON FAO., SIMPSON RJ., CONNOLLY LM., & CHAI SY. 2001. Evidence that the angiotensin IV (AT4) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 276, 48623-48626.
- ALDERMAN MH., MADHAVAN S., OOI WL., COHEN H., SEALEY JE. & LARAGH JH. 1991. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 324: 1098-1104.
- ALLEN A, ZHUO J, & MENDELSON F. 1999. Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 [Suppl 11]:S23-S29
- ALLEN A., MACGREGOR D., MCKINLEY M. & MENDELSON F. 1999. Angiotensin II receptors in the human brain. *Regul Pept* 79:1-7.
- ANDERSON GJ., & CONNOR WE. 1994. Accretion of n-3 fatty acids in the brain and retina of chick fed a low linolenic acid diet supplemented with docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr* 59(6): 1338-1346.
- AOYAGI T., TOBE H., KOJIMA F., HAMADA M. & UMEZAWA, H. 1978. Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced in actinomycetes. *J Antibiot* 31: 636-638.
- APPELL J., MILLER ER., SIDLER AJ. & WELTON PK. 1993. Does supplementation of diet with "fish oil" reduce blood pressure?. A meta analysis of controlled clinical trial. *Arch Intern Med* 153: 1429-1438.
- ARECHAGA G, SANCHEZ B, PRIETO I, MARTINEZ JM, ALBA F, & RAMIREZ M. 1996. Subcellular distribution of leucine aminopeptidase during the development and aging of rat brains. *Rev Neurol* 24(136):1503-6.
- ARECHAGA, G., MARTINEZ, JM., PRIETO, I., RAMIREZ, MJ., SANCHEZ, MJ., ALBA, F., DE GASPARO, M. & RAMIREZ, M. 2001. Serum aminopeptidase A activity of mice is related to dietary fat saturation. *J Nutr* 131, 1177-1179.
- ARMENTROUT RN. 1969. Pyrrolidonecarboxyl peptidase from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 191: 756-759.
- ARMSTRONG B., VAN MERWYK AJ. & COATES H. 1977. Blood pressure in seventh-day Adventist vegetarians. *Am J Epidemiol* 105: 444-449.
- ASCHERIO A., RIMM EB., GIOVANNUCCI EL., COLDITZ GA., ROSNER B., WILLETT WC., SACKS R. & STAMPFER MJ. 1992. A prospective study of nutritional factors and hypertension among U.S. men. *Circulation* 86: 1475-1484.

- ASSINDER SJ, CAREY M, PARKINSON T & NICHOLSON HD. 2000. Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. *Biol Reprod* 63: 448-456.
- AVERILL D. & DIZ D. 2000. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull* 51:119-128.
- AWADÉ AC., CLEUZIAT P., GONZALES T. & ROBERT-BAUDOUV J. 1994. Pyrrolidone carboxyl peptidase an enzyme that removes pyroglutamic acid (pGlu) from pGlu-peptides and pGlu-proteins. *Proteins: Struct Funct Genet* 20: 34-51.
- AZUMA H., NIIMI & HAMASAKI H. 1992. Prevention of intimal thickening after endothelial removal by a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, losartan. *Br J Pharmacol* 106: 665-671.
- BACHMAIR A., FINLEY D. & VARSHAVSKY A. 1986. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234: 179.
- BADER H., PETERS J., BACTATU O., MÜLLER DN., LUFT FC. & GANTEN D. 2001. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 79: 76-102.
- BÄLOW RM., RAGNARSSON U. & ZETTERQUIST D. 1983. Tripeptidyl aminopeptidase in the extralysosomal fraction of rat liver. *J Biol Chem* 258: 11622-11628.
- BALTATU O., BADER M. & GANTEN D. 1998. Functional testing of components of the brain renin-angiotensin system in transgenic animals. In: Ulfendahl H, Aurell M (eds) *Renin-angiotensin*. Portland, London, pp 105-114.
- BALTATU O., BADER M. & GANTEN D. 2000. Angiotensin. In: Fink G (ed) *Encyclopedia of stress*. Academic, New York, pp 195-199.
- BARNES K., MATSAS R., HOOPER NM., TURNER AJ. & KENNY AJ. 1988. Endopeptidase-24.11 is striosomally ordered in pig brain and in contrast to aminopeptidase N and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme), is a marker for a set of striatal efferent fibres. *Neuroscience* 27: 799-817.
- BARNES K. KENNY AJ. & TURNER AJ. 1994. Localization of aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV in pig striatum and in neuronal and glial cell cultures. *Eur J Neurosci* 6:531-537.
- BARRET AJ. 1977. (Ed.). *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. Pp. 331-391.
- BARRET, AJ., RAWLINGS, ND. & WOESSNER JR., J.F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, 1998.
- BARRETO-CHAVES M, & MELLO-AIRES M. 1996. Effect of luminal angiotensin II and ANP on early and late cortical distal tubule HCO₃ reabsorption. *Am J Physiol* 271:F977-F984

- BAUER K. 1987. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature*, 330: 375-377.
- BAUER K., NOWAK P. & KLEINKAUF H. 1981. Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thiroliberin at pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem* 118 (1): 173-176.
- BAUER K., CARMELIET P., SCHULZ M., BAES M. & DENEFF C. 1990. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glia and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 127. (3): 1224-1233.
- BEHAL FJ., KLEIN RA. & DAWSON FB. 1966. Separation and characterization of aminopeptidase and arylamidase components of human liver. *Arch Biochem Biophys* 115: 545-554.
- BEILIN LJ. 1987. State of the art lecture. Diet and hypertension: critical concepts and controversies. *J Hypertens* 5 (Suppl. 5): S447-S457.
- BEILIN LJ. 1992. Dietary fatty acids and blood pressure. In Sinclair, A., Gibson, R., (eds.) *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*. pp. 334-338.
- BELHACENE N., MARI B., ROSSI B. & AUBERGER P. 1993. Characterization and purification of T lymphocyte aminopeptidase B: a putative marker of T cell activation. *Eur J Immunol* 23: 1948-1955.
- BENAJIBA A. & MAROUX S. 1980. Purification and characterization of an aminopeptidase A from hag intestinal brush-border membrane. *Eur J Biochem* 107: 381-388.
- BENTER IF., DIZ DI. & FERRARIO CM. 1993. Cardiovascular actions of angiotensin [1-7]. *Peptides* 14: 679-684.
- BERNARD B., MARTIN R., DOMINIQUE H., FABRIZIO B., GIANFRANCO D., & FELIX G. 1987. Cholesterol, arterial pressure and cigarette smoking in the Swiss population: the MONICA project. *Soz Präventivmed.* 32(2):69-77.
- BERRY EM. & HIRSCH J. 1986. Does dietary linolenic acid influence blood pressure? *Am J Clin Nutr* 44: 336-340.
- BICKERTON R & BUCKLEY J. 1961. Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:834-837.
- BLADJERG EM., THOLSTRUP T., MARCKMANN P. & SANDSTROM B. 1995. Dietary changes in fasting levels of Factor VII coagulant activity are accompanied by changes in factor VII protein and other vitamin K-dependent proteins. *Tromb Haemost* 73: 239-242.
- BLESBOIS E., LESSIRE M., GRASSEAU I., HALLOUIS JM., HERMIER D. BROSNIHAN KB., LI P., GANTEN D. & FERRARIO CM. 1997. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am J Physiol* 273:1098-15.

- BÖHM M., LIPPOLDT A., WIENEN W., GANTEN D. & BADER M. 1996. Reduction of cardiac hypertrophy in TGR (mREN2)27 by angiotensin II receptor blockade. *Mol Cell Biochem* 163-164:217-221.
- BONAA KH., BJERVE KS., STRAUME B., GRAM IT. & THELLE D. 1990. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension. A population-based intervention trial from the Tromso study. *N Engl J Med* 322(12): 795-801.
- BONANONE A. & GRUNDY SM. 1988. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med* 318: 1244-1248.
- BONANOME A, PAGNAN A, BIFFANTI S. OPPORTUNO A., SORGATO F., DORELLA M., MAIORINO M. & URSINI F. 1992. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb* 12: 529-533.
- BONNARDEAUX J. & REGOLI D. 1974. Action of angiotensin and analogues on the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 52:50-60.
- BOOZ G. & BAKER K. 1995. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 30:537-543.
- BOTTARI SP., DE GASPARO M., STECKELINGS UM. & LEVENS NR. 1993. Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol* 14: 123-171.
- BOURRE JM., NONNEIL M., DUMONT O., PICIOTTI M., CLAAF R., PORTUGAL H., NALBONE G. & LAFONT H. 1990. Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fatty acid composition. *Biochim Biophys Acta* 1043: 149-152.
- BRADFORD, MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- BROSNIHAN KB., LI P., GANTEN D. & FERRARIO CM. 1997. Estrogen protects transgenic hypertensive rats by shifting the vasoconstrictor-vasodilator balance of RAS. *Am J Physiol* 273:R1908-15.
- BROWN NJ., CHEN Y-Q., & VAUGHAN DE. 1998. Synergistic effects of aldosterone and angII on PAI-1 expression. *Circulation* 98: 1519.
- BROWN NJ., AGIRBASLI M., & VAUGHAN DE. 1999. Comparative effects of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II type I receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans. *Hypertension* 34: 285-290.
- BROWN SA., FINCO DR., BARTGES JW., BROWN CA. & BARSANTI JA. 1998. Interventional nutrition for renal disease. *Clin Tech Small Anim Pract* 13: 217-23.
- BROWNE P. & O'CUINN G. 1983. An evaluation of the role of a pyroglutamate aminopeptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro. *Eur J Biochem* 137: 75-87.

- BUNNEMANN B., FUXE K. & GANTEN D. 1992. The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 [Suppl 6]:S51-62.
- BUNNEMANN B., FUXE K., METZGER R., BJELKE B. & GANTEN D. 1992. The semi-quantitative distribution and cellular localization of angiotensinogen mRNA in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 5:245-262.
- BURBACH JP., SCHOOTS O. & HERNANDO F. 1998. Biochemistry of vasopressin fragments. *Prog Brain Res* 119: 127-36.
- BURR ML., FEHILY AM., GILBERT MJ., ROGERS S, HOLLIDAY RM., SWEETNAM PM., ELWOOD PC., & DEADMAN NM. 1989. Effects of changes in fat, fish and fiber intakes on death and myocardial infarction. *Lancet* 2:757-761
- BURT DW., BEECROFT LJ., MULLINS JJ., PIOLI D., GEORGE H. & BROOKS J. 1985. Mouse renin gene structure, evolution and function. En: *Aspartic proteinases and their inhibitors* (ed. Kotska, V.) Walter de Gruyter, Berlin. Pp: 355-377.
- BURT DW., NAKAMURA N., KELLY P. & DZAU VJ. 1989. Identification of negative and positive regulatory elements in the human renin gene. *J Biol Chem* 264: 7357-7362.
- CAGNACCI A, ROVATI L, ZANNI A, MALMUSI S, FACCHINETTI F & VOLPE A. 1999. Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2):H1355-60.
- CALHOUN DA., ZHU ST., CHEN YF. & OPARIL S. 1995. Gender and dietary NaCl in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 26:285-9.
- CALLEJA L., TRALLERO MC., CARRIZOSA C., MENDEZ MT., PALACIOS-ALAIZ E. & OSADA J. 2000. Effects of dietary fat amount and saturation on the regulation of hepatic mRNA and plasma apolipoprotein A-I in rats. *Atherosclerosis* 152(1):69-78.
- CAMPBELL D., BOUHNICK J., MENARD J. & CORVOL P. 1984. Identity of angiotensinogen precursors of rat brain and liver. *Nature* 308:206-208.
- CAMPBELL DJ. & KLADIS A. 1990. Simultaneous radioimmunoassay of six angiotensin peptides in arterial and venous plasma of man. *J Hypertens* 8: 165-172.
- CAMPBELL D, LAWRENCE A, TOWRIE A, KLADIS A, & VALENTIJN A. 1991. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. *Hypertension* 18:763-773
- CARRETERO OA. & SCILI AG. 1991. Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* 18 (suppl I) I58-I69.
- CASTRO HG., BIRCH NP. & LOH YP. 1989. Regulated secretion of pro-opiomelanocortin converting enzyme and an aminopeptidase B-like enzyme from dispersed bovine intermediate lobe pituitary cells. *J Neurochem* 52: 1619-1628.

- CERVENKA L, WANG C, MITCHELL K, & NAVAR L. 1999. Proximal tubular angiotensin II levels and renal functional responses to AT1 receptor blockade in nonclipped kidneys of Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 33:102-107
- CHAKI S. & INAGAMI T. 1992. A newly found angiotensin II receptor subtype mediates cyclic GMP formation in differentiated Neuro-2^a cells. *Eur J Pharmacol* 225: 355-356.
- CHAN JK., McDONALD BE., GERRARD JM., BRUCE VM., WEAVER BJ. & HOLUB BJ. 1993. Effect of dietary alpha-linolenic acid and its ratio to linoleic acid on platelet and plasma fatty acids and thrombogenesis. *Lipids* 28(9):811-7.
- CHARLI JL., CRUZ C., VARGAS MA. & JOSEP-BRAVO P. 1988. The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 13: 237-242.
- CHEN RH., SARNECKI C. & BLENIS J. 1992. Nuclear localization and regulation of erk and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12: 915-927.
- CHEN Z., YUHANNA IS., GALCHEVA-GARGOVA Z., KARAS RH., MENDELSON ME. & SHAUL PW. 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103(3):401-6.
- CHEUNG HS. & CUSHMAN DW. 1971. A soluble aspartate aminopeptidase from dog kidney. *Biochim Biophys Acta* 242: 190-193.
- CHILDS MT., DORSETT CS., KING IB., OSTRANDER JG. & YAMANAKA WK. 1990. Effects of shellfish consumption on lipoproteins in normolipidemic men. *Am J Clin Nutr* 51(6):1020-7.
- CHIU AT., McCALL DE., PRICE WA., WONG PC., CARINI DJ. & DUNCIA JV. 1988. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonist. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DUP753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 711-718.
- CIOCCA S., AREA M., MONTALI A., FAZIO S., BUCCI A., ANGELICO F. & THE ROMAN GROUP FOR EPIDEMIOLOGY AND PREVENTION OF CHOLELITHIASIS (GREPO). 1987. Lack of association between arterial blood pressure and erythrocyte fatty acid composition in an Italian population sample. *Scand J Clin Lab Invest.* 47: 105-110.
- COBIAC L., NESTEL PJ., WING LMH. & HOWE PRC. 1992. A low-sodium diet supplemented with fish oil lowers blood pressure in the elderly. *J Hypertens* 10: 87-92.
- COFFEY JW. & DE DUVE C. 1968. Digestive activity of lysosomes. *J Biol Chem* 243: 3255-3263.
- COLEMAN JK., ONG B., SARDINIA M., HARDING JW & WRIGHT JW. 1992. Changes in renal blood flow due to infusions of angiotensin II (3-8) [AIV] in normotensive rats. *FASEB J* 6: A981.

- CONSTAM DB., TOBLER AR., RENSING-EHL A., KEMLER I., HERSH LB. & FONTANA A. 1995. Puromycin sensitive aminopeptidase sequence analysis, expresion, and functional characterization. *J Biol Chem* 270: 26931-26939.
- COSENTINO F. & LÏSCHER TF. 1998. Tetrahydrobiopterin and endothelial function. *Eur Heart J* 19: G3-G8.
- COUX O., TANAKA K. & GOLDBERG AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65: 801-847.
- COX JW., RUTECKI GW., FRANCISCO LL. & FERRIS TF. 1982. Studies of the effects of essential deficiency in the rat. *Circ Res* 51: 694-702.
- CRISCIONE L., BRADLIY WA., BÜHLMAYER P., WHITEBREAD S., GLAZER R., LLOYD P., MULLER P. & DE GASPARO M. 1995. Valsartan: Preclinical and clinical profile of an antihypertensive antiotensin II antogonist. *Cardiovasc Drug Rev* vol 133: 230-250.
- CRUZ C., CRARLI JL., VARGAS MA. & JOSEP-BRAVO P. 1991. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in prymare cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem* 56: 1594-1601.
- CSIKOS T., CHUNG O. & UNGER T. 1998. Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT2 receptor. *J Hum Hypertens* 12:311-318.
- CUMMINS PM. & O´CONNOR B. 1996. Bovine brain pyroglutamil aminopeptidase. *Int J Biochem Cell Biol* 28: 883-893.
- CUMMINS PM. & O´CONNOR B. 1998. Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim Biophys Acta* 1429, 1-17.
- CUNNANE S. 1992. Cholesterol lowering by alpha-linolenic acid. *Am J Clin Nutr* 55(1):140-1.
- CUNNANE S. 1995. Metabolism and function of alpha-linolenic acid in the humans. In Cunnane SC., Thompson LU. (eds): "Flaxseed in human nutrition." Champaign, IL: AOAC Press, pp 99-127.
- CURTHOYS NP. 1987. Extracellular catabolism of glutatione. In: *Mammalian Ectoenzymes* (Kenny a.j. & Turner A.J. eds). Amsterdam: Elsevier, pp:249-264.
- DAEMEN MJ., LOMBARDI DM., BOSSMAN FT., & SCHWARTZ SM. 1991. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat wall. *Circ Res* 68: 450-456.
- DANDO PM., YOUNG NE. & BARRET AJ. 1997. Aminopeptidase PS: awidely distributed cytosolic peptidase. In: *Proteolysis in Cell Functions*. Proceeding of the 11th International Conference on Proteolysis and Protein Turnover (Hopsu-Have VK., ed.). Amsterdam: IOS Press, pp. 88-95.
- DANSER AHJ., KATS JP., ADMIRAAL PJJ., DERKX FHM., LAMERS JMJ., VERDOUW PD., SAXENA PR. & SCHALEKAMP MADH. 1994. Cardiac renin and angiotensins: Update from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24: 37-48.

- DANSER A., VAN KATS J., ADMIRAAL P., DERKX F., LAMERS J., VERDOUW P., SAXENA P. & SCHALEKAMP M. 1994. Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 24:37-48.
- DARBY I. & SERNIA C. 1995. In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res* 281:197-206
- DAVIDSON E. & POOLE B. 1975. Fractionation of the rat liver enzymes that hydrolyse benzoil-arginine-2-naphthylamide. *Biochem Biophys Acta* 397: 437-442.
- DAVIGNON J., GREGG RE. & SING CF. 1988. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 8: 1-21.
- DAVISSON R., OLIVERIO M., COFFMAN T. & SIGMUND C. 2000. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest* 106:103-106.
- DE LORGERIL M., SALEN P., MARTIN J.M., MONJAUD I., DELAYE J. & MAMELLE N. 1999. Mediterranean diet. Traditional risk factors , and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Heart Study. *Circulation* 9: 779-785.
- DE SILVA PE., HUSAIN A., SMEBY RR & KHAIRALLAH PA. 1988. Measurement of immunoreactive angiotensin peptides in rat tissues: some pitfalls in angiotensin II analysis. *Anal Biochem* 174: 80-87.
- DE SOUZA ANC., BRUNO JA. & CARVALHO KM. 1991. An enkephalin-degrading aminopeptidase of human brain preserved during the vertebrate phylogeny. *Comp Biochem Physiol (C)* 99C: 363-367.
- DEHM P. & NORWIG A. 1970. The cleavage of prolylpeptidees by kidney peptidases. Isolation of a microsomal carboxypeptidase from swine kidney. *Eur J Biochem* 17: 372-377.
- DELAFONTAINE P. 1998. Growth factors and vascular smooth muscle responses. *Eur Heart J* 19: G18-G22.
- DELARIA K., FIORENTINO L., WALLACE L., TAMBURINI P., BROWNELL E. & MULLER D. 1994. Inhibition of cathepsin L-like cysteine proteases by cytotoxicT-lymphocyte antigen28. *J Biol Chem* 269: 25172-25177.
- DELMAS B., GELFI J., L´HARIDON R., VOGEL LK., SJÖSTRÖM H., NORÉN O. & LAUDE H. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 357: 417-420.
- DENKE MA. & GRUNDY SM. 1992. Comparison of effects of lauric acid and palmitic acid on plasma lipids and lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 56: 895-898.
- DESCHEPPER CF. & DALLMAN MF. 1992. The stimulation of liver angiotensinogen by glucocorticoids depends on the type of steroid and its made of administration. *Endocrinology* 131: 2371-2377.
- DIBONA G. 1999. Central sympathoexcitatory actions of angiotensin II: role of type 1angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* 10:S90-S94.

- DIETZ F., DZAU VJ., & PRATT RE. 1996. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94: 2766-2767.
- DOEBBER TW. DIVOR AR. & ELLIS S. 1978. Identification of a tripeptidyl aminopeptidase in the anterior pituitary gland: effect on the chemical and biological properties of rat and bovine growth hormone. *Endocrinology* 103: 1794-1804.
- DONADIO J. 2000. Use of fish oil to treat patients with immunoglobulin A nephropathy. *Am J Clin Nutr* 71: 373S-5S.
- DOOLITTLE RF. & ARMENTROUT RW. 1968. Pyrrolidonyl peptidase: an enzyme for selective removal of pyrrolidone-carboxylic acid residues from polypeptides. *Biochemistry* 7(2): 516-521
- DORGAN JF., JUDD JT., LONGCOPE C., BROWN C., SCHATZKIN A., CLEVIDENCE BA., CAMPBELL WS., NAIR PP., FRANZ C., KAHLE L. & TAYLOR PR. 1996. Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgen and estrogens in men: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 64:850-5.
- DOSTAL D. 2000. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept* 91:1-11.
- DUBEY RK. & JACKSON EK. 2001. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F365-88.
- DUBEY RK., JACKSON EK., KELLER PJ., IMTHURN B. & ROSELLI M. 2001. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension* 37:640-4.
- DUBEY RK., OPARIL S., IMTHURN B. & JACKSON EK. 2002. Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* 53:688-708.
- DUNNE FP., BARRY DG., FERRIS JB., GREALY G. & MURPHY D. 1991. Changes in blood pressure during the normal menstrual cycle. *Clin Sci* 81:515-8.
- DZAU VJ., BURT DW & PRATT RE. 1988. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 255. F563-F573.
- DZAU VJ. 1990. Mechanism of action of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in hypertension and heart failure. *Drugs* 39: (Suppl. 2) 11-16.
- DZAU VJ. & RE R. 1994. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: a paradigm shift. *Circulation* 89: 493-498.
- DZAU VJ. 1998. Mechanism of protective effects of ACE inhibition on coronary artery disease. *Eur Heart J* 19: 2-6.
- ELLIOTT P., FEHILY AM., SWEETNAM PM. & YARNELL JWG. 1987. Diet, alcohol, body mass, and social factors in relation to blood pressure: the Caerphilly Heart Study. *J Epidemiol Community Health*. 41: 37-43.
- ELLIS S. & NUENKE JM. 1967. Dipeptidyl arylamidase III of the pituitary. Purification and characterization. *J Biol Chem* 242: 4623-4629.

- ELMORE MA., GRIFFITHS EC., O'CONNOR B. & O'CUINN G. 1990. Further characterization of the substrate specificity of a TRH-hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 15: 31-36.
- ENDO-MOCHIZUKI Y., MOCHIZUKI N., SAWA H., TAKADA A., OKAMOTO H., KAWAGUCHI H., NAGASHIMA K. & KITABATAKE A. 1995. Expression of renin and angiotensin-converting enzyme in human hearts. *Heart Vessels* 10:285-293.
- ERDOS E. 1990. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl Memorial Lecture. *Hypertension* 16:363-370
- ESCUDERO A., MONTILLA JC., GARCIA JM., SANCHEZ-QUEVEDO MC., PERIAGO JL., HORTELANO P. & SUAREZ MD. 1998. Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1394(1):65-73.
- ESTHER, CR., MARINO, EM. & BERNSTEIN, KE. 1997. The role of angiotensin-converting enzyme in blood pressure control, renal function, and male fertility. *Trends Endocrinol Metab* 8, 181-186.
- FAO/OMS, consulta de expertos. 1993. *Grasas y aceites en la nutrición humana*.
- FELGENHAUER K. & GLENNER GG. 1966. The enzymatic hydrolysis of amino acid-b-naphthylamidases. II. Partial purification and properties of a peptide-bound cobalt-activated rat kidney aminopeptidase. *J Histochem Cytochem* 14: 401-413.
- FELIX D., KHOSLA M., BARNES K., IMBODEN H., MONTANI B. & FERRARIO C. 1991. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). *Hypertension* 17:1111-1114.
- FERACCI H. & MAROUX S. 1980. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta* 599: 448-463.
- FERNANDEZ ML., SOSCIA AE., SUN GS. TOSCA M., MCNAMARA DJ. & MCDONALD BE. 1996. Olive oil and rapeseed oil differ in their effect on plasma low-density lipoprotein metabolism in the guinea-pig. *Br J Nutr* 76(6):869-80.
- FERRARIO CM., BROSNIHAN KB., DIZ DI., JAISWAL N., KHOSLA MC. & MILSTED A. 1991. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 18: III126-III133.
- FERRARIO CM., DEITCH JS., DEAN RH. & STAWN WB. 1996. Hypertension and atherosclerosis: a mechanistic understanding of disease progression. *Cardiovasc Risk Factors* 6: 299-310.
- FIELD AE., COLDITZ GA., WILLETT WC., LONGCOPE C. & MCKINLAY JB. 1994. The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex-hormone-binding globulin in middle-aged men. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1310-6.
- FITZSIMMONS J. 1971. The effect of drinking on peptide precursors and short chain peptide fragments of angiotensin II injected into the rat's diencephalon. *J Physiol* 214: 295-301.

- FITZSIMONS J. 1998. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78:583-686.
- FLORES M., ARISTOY MC. & TOLDRA F. 1993. HPLC purification and characterization of porcine muscle aminopeptidase B. *Biochimie* 75: 861-867.
- FLORES M., ARISTOY MC. & TOLDRA F. 1996. HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *J Agric Food Chem* 44: 2578-2583.
- FOLK JE. 1956. A new pancreatic carboxypeptidase. *J Am Chem Soc* 78: 3541-3542.
- FOULON T., CADEL S., CHESNEAU V., DRAOUI M., PRAT A. & COHEN P. 1996. Two novel metallopeptidases with a specificity for basic residues. Functional properties, structure and cellular distribution. *Ann N Y Acad Sci* 780: 106-120.
- FOULON T., CADEL S., PRAT A., CHESNEAU V., HOSPITAL V., SEGRETAİN D. & COHEN P. 1997. NRDconvertase and aminopeptidase B: two putative processing metallopeptidases with a selectivity for basic residues. *Ann Endocrinol* 58: 357-364.
- FRUTON JS. & BERGMANN NM. 1939. On the proteolytic enzymes of animal tissues Y beef spleen. *J Biol Chem* 130: 19-27.
- FUNKHOUSER JD., TANGADA SD., JONES M. & PETERSON RD. 1991. P146 type II alveolar epithelial cell antigen is identical to aminopeptidase N. *Am J Physiol* 260: L274-L279.
- FURGUSON J., MACKAY N., & McNICOL G. 1970. Effect of feeding fat on fibrinolysis, Stypven time, and platelet aggregation in Africans, Asians, and Europeans. *J Clin Pathol* 23: 580-585.
- GAINER H., RUSSELL JT. & LOH YP. 1984. An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from B-lipotropin. *FEBS Lett.* 175: 135-139.
- GALLAGHER PE., LI P., LENHART JR., CHAPPELL MC. & BROSHIHAN KB. 1999. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 33:323-8.
- GANONG WF. 1994. *Fisiología Médica*. Manual Moderno, ed. 14^a.
- GANTEN D., HAYDUK K., BRECHT HM., BOUCHER R. & GENEST J. 1970. Evidence of renin release or production in splanchnic territory. *Nature* 226:551-552.
- GANTEN D, MINNICH J., GRANGER P., HAYDUK K., BRECHT H., BARBEAU A., BOUCHER R. & GENEST J. 1971. Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 173:64-65.
- GANTEN D. 1972. *Studies on the existence of an independent brain renin-angiotensin-system: a model for extrarenal tissue renin*. Dissertation, Department of Experimental Medicine, McGill University, Montreal.

- GARAT B., MIRANDA J., CHARLI JL. & JOSEPH-BRAVO P. 1985. Presence of a membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neuropeptides* 6: 27-40.
- GARCÍA-CLOSAS R., SERRA-MAJEM L. & SEGURA R. 1993. Fish consumption, 3-fatty acids and the mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr* 47: 85-90.
- GARG A., GRUNDY SM., & KOFFLER M. 1992. Effect of high carbohydrate intake on hyperglycemia, islet cell function, and plasma lipoproteins in NIDDM. *Diabetes Care* 15, 1572-1580.
- GARIEPY J., MASSONNEAU M., & MEGNEIN JL. 1994. *Diffuse large artery wall thickening in essential hypertension*. 15th Scientific meeting of the International Society of hypertension, Melbourne, Australia.
- GARLAND HO. 1987. Effects of thyrotropin-releasing hormone on renal function in the rat. *J Endocrinol* 113: 445-8.
- GENDRON L., LAFLAMME L., RIVARD N., ASSELIN C., PAYET M. & GALLO-PAYET N. 1999. Signals from the AT2 (angiotensin type 2) receptor of angiotensin II inhibit p21ras and activate MAPK (mitogen-activated protein kinase) to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells. *Mol Endocrinol* 13:1615-1626.
- GEY KF., PUSKA P., JORDAN P. & MOSER UK. 1991. Inverse correlation between plasma vitamin E and Mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr* 53: 326s-334s.
- GILTAY EJ., HOOGEVEEN EK., ELBERS JM., GOOREN LJ., ASSCHEMAN H. & STEHOUWER CD. 1998. Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels: a study in transsexual males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 83(2):550-3.
- GIRON MD., MATAIX FJ., FAUS MJ. & SUAREZ MD. 1989. Effect of long-term feeding olive and sunflower oils on fatty acid composition and desaturation activities of liver microsomes. *Biochem Int* 19(3):645-56.
- GLENNER GG, McMILLAN DJ. & FOLK JE. 1962. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal α -L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194: 867.
- GOMEZ R, LYNCH K, CHEVALIER R, EVERETT A, JOHNS D, WILFONG N, PEACH M, & CAREY R. 1988. Renin and angiotensinogen gene expression and intrarenal renin distribution during ACE inhibition. *Am J Physiol* 254:900-906.
- GOMORI G. 1954. Chromogenic substrates for aminopeptidase. *Proc Soc Exp Biol Med* 87. 559-561.
- GONDO M., MARUTA H. & ARAKAWA K. 1989. Direct formation of angiotensin II without renin or converting enzyme in the ischemic dog heart. *Jpn Heart J* 30:219-229.

- GONZALEZ CB., HERRERA VL. & RUIZ-OPAZO N. 1997. Renal immunocytochemical distribution and pharmacological properties of the dual angiotensin II / AVP receptor. *Hypertension* 29: 957-61.
- GREENBERG, LJ. 1962. Fluorimetric measurement of alkaline phosphatasa and aminopeptidase activities in the order of 10⁻¹⁴ mole. *Biochem Biophys Res Commun* 9, 430-435.
- GRIENDLING KK., USHIO FUKAI M., LASSEGUE B. & ALEXANDER RW. 1997. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* 29: 366-373.
- GROS C., GIROS B. & SCHWARTZ J-C. 1985. Identification of aminopeptidase M as an enkephalin-inactivating enzyme in rat cerebral membranes. *Biochemistry* 24: 2179-2185.
- GRUCHOW HW., SOBOCINSKI KA. & BARBORIAK JJ. 1985. Alcohol, nutrient intake and hypertension in U.S. adults. *J Am Med Assoc* 253: 1567-1570.
- GRUNDY SM., BILHEIMER D., BLACKBURN H., BROWN WV., KWITEROVICH PJ., MATTSON F., SCHONFELD G. & WEIDMAN WH. 1982. Rationale of the diet-heart statement of the American Heart Association. Report of nutrition Committee. *Circulation* 65: 839-854.
- GRUNDY SM. 1989. Monounsaturated fatty acids and cholesterol metabolism: implication for dietary recommendation. *J Nutr* 119: 529-533.
- GRUNDY SM. & DENKE MA. 1990. Dietary influences in serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 31:1149-1171.
- GURR CI. 1999. *Lipids in nutrition and Health: a reappraisal*. The oily press.
- GUZMAN LA. 2000. Un nuevo objetivo terapéutico en la enfermedad coronaria aterosclerótica: ¿la inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona es antiisquémica?. *Rev Fed Arg Cardiol* 29: 305-312.
- HABITO RC & BALL MJ. 2001. Postprandial changes in sex hormones after meals of different composition. *Metabolism* 50:505-11.
- HACKENTHAL E. & NOBILING R. 1994. Renin secretion and its regulation. In: *Textbook of Hypertension*, (ed. Swales j.d.) Blackwell Scientific Publications. London. pp: 232-244.
- HAELY DP. & WILK S. 1993. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain, II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res* 606: 295-303.
- HALL JE., MIZELLE HL., HILDEBRANDT DA. & BRANDS MW. 1990. Abnormal pressure-natriuresis: a cause or consequence of hypertension. *Hypertension* 15:547-59.
- HAMALAINEN E., ADLERCREUTZ H., PUSKA P. & PIETINEN P. 1984. Diet and serum sex hormones in healthy men. *J Steroid Biochem* 20:459-64.
- HARLAN WR., HULL AL., SCHMOUDER RL., LANDIS JR, THOMPSON FE. & LARKIN FA. 1984. Blood pressure and nutrition in adults. *Am J Epidemiol* 120: 17-28.

- HARRIS WS. 1989. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J Lipid Res* 30(6):785-807.
- HARRIS WS., GINSBERG HN., ARUNAKUL N., SHACHTER NS., WINDSOR SL., ADAMS M., BERGLUND L. & OSMUNDSEN K. 1997. Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. *J Cardiovasc Risk* 4: 385-392.
- HEALY DP., YE M-Q, YUAN L-X & SCHACHTER BS. 1992. Stimulation of angiotensinogen mRNA levels in rat pituitary by estradiol. *Am J Physiol* 263: E355-E361.
- HEALY DP., & WILK S. 1993. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. II. Distribution and correlation with angiotensin II. *Brain Res* 606: 295-303.
- HEGSTED DM., MCGANDY RB., MYERS ML. & STARE FJ. 1965. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 17: 281-295.
- HEGSTED DM. & NICOLOSI RJ. 1990. Do formula diets attenuate the serum cholesterol response to dietary fats? *J Vasc Med Biol* 1: 68-73.
- HEGSTED DM., AUSMAN LM., JOHNSON JA. & DALLAL GE. 1993. Dietary fat and serum lipids: an evaluation of the experimental data. *Am J Clin Nutr* 57: 875-883.
- HENRICH W, MCALLISTER E, ESKUE A, MILLER T, & MOE O. 1996. Renin regulation in cultured proximal tubular cells. *Hypertension* 27:1337-1340
- HERNÁNDEZ M., SASTRE A. *Tratado de Nutrición*. 1999. (eds): Madrid. Díaz de Santos, S.A.
- HERMOSO CALATRAVA, FRANCISCO. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid. 2001.
- HERRERA 1991. *Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas*. Cap.5, 102-106. Ed. Interamericana. McGraw-Hill.
- HERSH LB. & MCKELVY JF. 1981. An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J Neurochem* 36: 171-178.
- HICKLER R., LAULER D. & THORN G. 1963. Plasma angiotensinase activity in patients with hypertension and edema. *J Clin Invest* 42: 635-648.
- HIROI Y., ENDO Y. & NATORI Y. 1992. Purification and properties of an aminopeptidase from rat-liver cytosol. *Arch Biochem Biophys* 294: 440-445.
- HOFFBRAND AV. & PETERS TJ. 1969. The subcellular localization of pteroyl-polyglutamate hydrolase and folate in guinea pig intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 192: 479-485.
- HOFFMANN T., FAUST J., NEUBERT K. & ANSORGE S. 1993. Dipeptidyl peptidase IV (CD26) and aminopeptidase N (CD13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences. *FEBS Lett* 354: 1-6.
- HOGARTY DC., SPEAKMAN EA., PUIG V. & PHILLIPS MI. 1992. The role of AT1 and AT2 receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to angiotensin II. *Brain Res* 586: 389-395.

- HOHLE S., SPITZNAGEL H., RASCHER W., CULMAN J. & UNGER T. 1995. Angiotensin AT1 receptor-mediated vasopressin release and drinking are potentiated by an AT2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 275:277-282.
- HONG-BROWN L. & DESCHEPPER DF. 1992. The stimulation of liver angiotensinogen gene expression in rat liver, brain, and cultured cells. *Endocrinology* 130: 1231-1237.
- HOPUSU VK., MAKINEN KK. & GLENNER GG. 1966. Purification of a mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: aminopeptidase B. *Arch Biochem Biophys* 114: 557-566.
- HOPUSU-HAVU VK. & GLENNER GG. 1966. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl- β -naphthylamide. *Histochemie* 7: 197-201.
- HORNIG B. & DREXLER H. 1997. Endothelial function and bradykinin in humans. *Drugs* 5: 42-47.
- HU F, STAMPFER MJ., MANSON J.E., RIMM E., COLDITZ GA., ROSNER BA., HENNEKENS CH., & WILLET WC. 1997. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 337: 1491-1499.
- HU F, SALMERON J, MANSON J, STAMPFER M, GOLDITZ G, RIMM E, & WILLETT W. 1999. Dietary fat and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Epidemiol* 149:S1.
- HU F, STAMPFER MJ., MANSON JB., ASCHERIO A., COLDITZ GA., SPEIZER FE., HENNEKENS CH., & WILLET WC. 1999. Dietary saturated fat and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am J Nutr* 70: 1001-1008.
- HU F, MANSON J, & WILLETT W. 2001. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *J Am Coll Nutr* 20, 5-19.
- HUDGINS LC., HIRSCH J. & EMKEN EA. 1991. Correlation of isomeric fatty acids in human adipose tissue with clinical risk factors for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 53: 474-482.
- HUI KS., WANG YJ., TSAI H. & LAJTHA A. 1981. Regional and subcellular distribution of Met- and Leu-enkephalin- degrading activity in rat brain. *Neuropeptides* 1: 167-173.
- HUI KS., GRAFT L. & LAJTHA A. 1982. β -endorphin inhibits Met-enkephalin breakdown by a brain aminopeptidases structure-activity relationships. *Biophys Res Commun* 105: 1482-1487.
- HUI KS., WANG YJ, & LAITHA A. 1983. Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain membranes. *Biochemistry* 22: 1062-1067.
- HUI KS. & LAJTHA A. 1986. *Proteinases and peptidases*. Neuromethods vol 5, Neurotransmitter enzymes A. Boulton, GB. Boker and PH Yu (eds). Human press, New Jersey. 421-450.

- IACONO JM. & DOUGHERTY RM. 1993. Effects of polyunsaturated fats on blood pressure. *Annu Rev Nutr* 13: 243-260.
- INABA T, NAKAYAMA Y, TANI H, TAMADA H, KAWATE N & SAWADA T. 1999. Oxytocin gene expression and action in goat testis. *Theriogenology* 52:425-434.
- INGELFINGER J, ZUO W, FON E, ELLISON K, & DZAU V. 1990. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest* 85:417-423
- IODICE AA. 1967. The carboxypeptidase nature of cathepsin A. *Arch Biochem Biophys* 121: 21-242.
- ISHIDOH K., KOMINAMI E., KATUNUMA N. & SUZUKI K. 1989. Gene structure of rat cathepsin H. *FEBS Lett* 253: 103-107.
- ISHIURA S., YAMAMOTO T., YAMAMOTO M., NOJIMA M., AOVAGI T. & SUGITA H. 1987. Human skeletal muscle contains two major aminopeptidases: an anion activated aminopeptidase B and an aminopeptidase M like enzyme. *J Biochem* 88: 1601-1605.
- ITOH N., MATSUDA T., OHTANI R. & OKAMOTO H. 1989. Angiotensinogen production by rat hepatoma cells is stimulated by B cell stimulatory factor 27interleukin-6. *FEBS Lett* 244: 6-18.
- ITOH C & NAGAMATSU A. 1995. An aminopeptidase activity from porcine kidney that hydrolyzes oxytocin and vasopressin: purification and partial characterization. *Biochim Biophys Acta* 1243:203-208.
- IWAI N., & INAGAMI T. 1992. Quantitative analysis of renin gene expression in extrarenal tissues by polymerase chain reaction method. *J Hypertens* 10:717-724.
- JACOBS DR., BLACKBURN HM., REED D., ISO H., MCMILLAN G., NEATON J., RIFKIND B., ROSSOUW J. & SHEKELLE R. 1992. Report of the conference on low blood pressure: mortality associations. *Circulation* 86: 1046-1060.
- JOFFRES MR., REED DM. & YANO K. 1987. Relationship of magnesium intake and other dietary factors to blood pressure: the Honolulu Heart Study. *Am J Clin Nutr* 45: 469-475.
- JONES CR., ARAI T. & RAPOPORT SI. 1997. Evidence for the involvement of docosahexaenoic acid in cholinergic stimulated signal transduction at the synapse. *Neurochem Res* 22(6): 663-670.
- JUDD JT., CLEVIDENCE BA., MUESING RA., WITTES J., SUNKIN ME. & PODCZASY JJ. 1994. Dietary *trans* fatty acids: effects on plasma lip ids and lipoproteins of healthy adult men and women. *Am J Clin Nutr* 59: 861-868.
- KAKAR SS., RIEL KK. & NEIL JD. 1992. Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (At-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 688-692.

- KALIN MF. & ZUMHOFF B. 1990. Sex hormones and coronary artery disease: a review of clinical studies. *Steroids* 55:330-52.
- KALNITSKY G., CHATTERJEE R., SINGH H., LONES M. & PASZKOWSKI A. 1983. Bifunctional activities and possible modes of regulation of some lysosomal cysteinyl proteases. In: *Proteinase inhibitors Medical and Biological Aspects*. (Katunuma N., Umezawa H. & Holzer H., eds) Tokio: Japan Scientific Societies Press; Berlin: Springer-Verlag, pp. 263-273.
- KANAYAMA N., KAIWARA Y., GOTO J., MARADNY E., MAEHARA K., ANDOU K. & TERAO T. 1995. Inactivation of interleukin-8 by aminopeptidase N (CD13). *J Leukoc Biol* 57: 129-134.
- KANIA RK., SANTIAGO NA. & GRAY GM. 1977. Intestinal surface amino-oligopeptidases. II. Substrate kinetics and topography of the active site. *J Biol Chem* 252: 4929-4934.
- KAPLAN NMM., LIEBERMAN E. & NEAL W. 2002. *Kaplan 's Clinical Hypertension*. 8^a ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- KAPLAN RJ. & GREENWOOD CE. 1998. Dietary saturated fatty acids and brain function. *Neurochem Res* 23(5): 615-626.
- KATAN MB. & BEYNEN AC. 1987. Characteristics of human hypo- and hyperresponders to dietary cholesterol. *Am J Epidemiol* 125: 387-399.
- KATAN MB., BERNS MA., GLATZ JF., KNUIMAN JT., NOBELS A. & DE VRIES JH. 1988. Congruence of individual responsiveness to dietary cholesterol and to saturated fat in humans. *J Lipid Res* 29(7): 883-892.
- KATAN MB. & ZOCK PL. 1995. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annu Rev Nutr* 15: 473-493.
- KATSUMATA Y., NOMURAS S., INO K., IWANAGA K., KUROSAWA N., ITOT, OKADA M., TSUJIMOTO M., KIKKAWA F. & MIZUTANI S. 2001. Progesterone stimulates the expression of aminopeptidase A / angiotensinase in human choriocarcinoma cells. *Placenta* 22: 831-836.
- KATWA L., RATAJSKA A., CLEUTJENS J., SUN Y., ZHOU G., LEE S. & WEBER K. 1995. Angiotensin converting enzyme and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the rat heart. *Cardiovasc Res* 29:57-64.
- KAWATA S., TAKAYAMA S., NINOMIYA J. & MAKISUMI S. 1980. Porcine liver aminopeptidase B. *J Biochem* 88: 1601-1605.
- KAY RM., SABRY ZI. & CSIMA A. 1980. Multivariate analysis of diet and serum lipids in normal men. *Am J Clin Nutr* 33: 2566-2572.
- KEIDAR S., KAPLAN M., SHAPIRA C., BROOK JG. & AVIRAM M. 1994. Low density lipoprotein isolated from hypertensive patients exhibits increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophages: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis* 107: 71-84.

- KELLER SR., SCOTT HM., MASTICK CC., AEBERSOLD R. & LIENHARD GE. 1995. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles. *J Biol Chem* 270: 23612-23618.
- KELLY JA., NEIDLE EL. & NEIDLE A. 1983. An aminopeptidase from mouse brain cytosol that cleaves N-terminal acidic amino acid residues. *J Neurochem* 40: 1727-1734.
- KELLY JA., LOSCHER CE., GALLAGHER S. & O'CONNOR B. 1997. Degradation of pyroglutamyl-phenylalanine-proline amide by a pyroglutamyl aminopeptidase purified from membrane fractions of bovine brain. *Biochem Soc Trans* 25: 114S.
- KERINS DM., HAO Q., & VAUGHAN DE. 1995. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide IV. *J Clin Invest* 96: 2515-2520.
- KESTIN M., CLIFTON P., BELLING GB. & NESTEL PJ. 1990. n-3 Fatty acids of marine origin lower systolic blood pressure and triglycerides but raise LDL cholesterol compared with n-3 and n-6 fatty acids from plants. *Am J Clin Nutr* 51: 1028-1034.
- KEYS A., ANDERSON JT. & GRANDE F. 1957. Prediction of serum-cholesterol response of man to changes in fats in the diet. *The Lancet* 2: 959-966.
- KEYS A., ANDERSON JT. & GRANDE F. 1959. Serum cholesterol in man: Diet, fat and intrinsic responsiveness. *Circulation* 19: 201-214.
- KEYS A. 1980. "Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease." Cambridge, MA: Harvard University Press.
- KHAW KT. & BARRETT-CONNER E. 1984. Dietary potassium and blood pressure in a population. *Am J Clin Nutr* 39: 963-968.
- KIJIMA K., MATSUBARA H., MURASAWA S., MARUYAMA K., OHKUBO N., MORI Y. & INADA M. 1996. Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene by protein kinase C-calcium pathways. *Hypertension* 27: 529-534.
- KIRSCHKE H., LANGNER J., WIEDERANDERS B., ANSORGE S., BOHLEY P. & HANSON H. 1977. Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes. *Acta Biol Med Ger* 36: 1855-199.
- KIRSCHKE H., PEPPERLE M., SCHMIDT I. & WIEDERANDERS B. 1986. Are there species differences amongst the lysosomal cysteine proteinases? *Biomed Biochim Acta* 45: 1441-1446.
- KNAPP HR. & FITZGERALD G. 1989. The antihypertensive effects of fish oil: A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N Engl J Med* 320: 1037-1043.
- KOMINAMI E., TSUKAHARA T., BANDO Y. & KATUNUMA N. 1985. Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *J Biochem* 98: 87-93.

- KRIS-ETHERTON P., & YU S. 1997. Individual fatty acids on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* 65: 1628S-1644S.
- KRISTIANSSON P & WANG JX. 2001. Reproductive hormones and blood pressure during pregnancy. *Hum Reprod* 16:13-7.
- KROMANN N. & GREEN A. 1980. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* 208(5):401-6.
- KROMHOUT D., BOSSCHIETER EB. & DEZENNE OULANDER C. 1985. The inverse relationship between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 312: 1205-1209.
- KROMHOUT D. 2001. Diet and cardiovascular diseases. *J Nutr Health Aging* 5(3):144-9.
- KRULEWITZ AH., BAUR WE. & FANBURG BL. 1984. Hormonal influence on endothelial cell angiotensin-converting enzyme activity. *Am J Physiol* 247: C163-C168.
- KUMAI T, TANAKA M, WATANABE M, NAKURA H & KOBAYASHI S. 1995. Influence of androgens on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 26:208-12.
- KUMAR KV. & DAS UN. 1997. Effect of cis-unsaturated fatty acids, prostaglandins, and free radicals on angiotensin-converting enzyme activity in vitro. *Pro Soc Exp Biol Med* 214: 374.
- KUNZ J., KRAUSE D., KREMER M. & DERMIETZEL R. 1994. The 140-Kda protein of blood-brain barrier-associated pericytosis identical to aminopeptidase N. *J Neurochem* 62: 2375-2386.
- LAFUSE WP., BROWN D., CASTLE L. & ZWILLING BS. 1995. IFN-g increases cathepsin H mRNA levels in mouse macrophages. *J Leukoc Biol* 57: 663-669.
- LAHOZ C., ALONSO R., ORDOVAS JM., LÓPEZ-FARRÉ A., DE OYA M., & MATA P. 1997. Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production platelet aggregation and blood pressure. *Eur J Clin Invest* 27: 780-787.
- LARAGH JH. 1992. Historical perspective on renin system blockade in the treatment of hypertension. *Am J Hypertens* 5(12 Pt 2):207S-208S.
- LARIVIERE R, ST-LOUIS J,& SCHIFFRIN EL. 1988. Vascular vasopressin receptors in renal hypertensive rats. *Am J Physiol* 255(4 Pt 2):H693-8.
- LEAF A. & WEBER PC. 1988. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N Engl J Med* 318: 549-557.
- LEWIS EJ., MUNSICKER LG., BAIN RP. & ROHDE RD. 1993. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetetic nephropathy. *N Engl J Med* 329: 1456-1462.
- LEYHAUSEN G., SCHUSTER DK., VAITH P., ZAHN RK., UMEZAWA H. FALKE D. & MÜLLER WEG. 1983. Identification and properties of the cell membrane bound leucine aminopeptidase interacting with the potential immunostimulant and chemotherapeutic agent bestatin. *Biochem Pharmacol* 32: 1051-1057.

- LEYSSAC P. 1986. Changes in single nephron renin release are mediated by tubular fluid flow rate. *Kidney Int* 30:332-339
- LI L., WU O., WANG J., BUCY RP. & COOPER MD. 1993. Wide-spread tissue distribution of aminopeptidase A, an evolutionary conserved ectoenzyme recognized by the BP-1 antibody. *Tissue Antigens* 42: 488-496.
- LIN Q., TANLUCHI I., KITAMURA D., WANG I., KEARNEY JF., WATANABE T. & COOPER MD. 1998. T and B cell development in BP-1/6C3/aminopeptidase A-deficient mice. *J Immunol* 160: 4681-4687.
- LIND R., SWANSON L. & GANTEN D. 1985. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 40:2-24.
- LINDPAINTNER K. & GANTEN D. 1991. The cardiac renin-angiotensin system: an appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res* 68:905-921.
- LINDERSTROM-LANG K. 1929. Unber darmerepsin. Hoppe-Seylers. *Z Physiol Chem* 182: 151-174.
- LINDSEY S., BENATTAR J., PRONCZUK A. & HAYES KC. 1990. Dietary palmitic acid (16:0) enhances high density lipoprotein cholesterol and low density lipoprotein receptor mRNA abundance in hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med* 195(2):261-9.
- LLOYD G, MCGING E, COOPER A, PATEL N, LUMB PJ, WIERZBICKI AS & JACKSON G. 2000. A randomised placebo controlled trial of the effects of tibolone on blood pressure and lipids in hypertensive women. *J Hum Hypertens* 14(2):99-104.
- LO M., LIU K.M., LANTELME P. & SASSARD J. 1995. Subtype 2 of angiotensin receptors control pressure natriuresis in rats. *J Clin Invest* 95: 1394-1397.
- LOJDA Z. & GOSSRAU R. 1980. Study on aminopeptidase A. *Histochemistry* 67: 267-290.
- LOOK AT., ASHMUN RA., SHAPIRO LH. & PEIPER SC. 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest* 83: 1299-1307.
- LOPEZ GH., ILINCHETA DE BOSCHERO MG., CASTAGNET PI. & GIUSTO NM. 1995. Age associated changes in the content and fatty acid composition of brain glycerophospholipids. *Biochem Physiol* 112(2): 331-343.
- LORENZ R., SPENGLER U., FISCHER S., DUHM J. & WEBER P. 1983. Platelet function, thromboxane formation and blood pressure control during supplementation of the western diet with cod-liver oil. *Circulation* 67(3): 504-511.
- LOVEJOY JC. 1999. Dietary fatty acids and insulin resistance. *Curr Atheroscler Rep* 1, 215-220
- LUI Y. & LONGMORE RB. 1997. Dietary sandalwood seed oil modifies fatty acid composition of mouse adipose tissue, brain and liver. *Lipids* 32(9): 965-969.

- MANTLE D., HARDY MF., LAUFFART B., MCDERMOTT JR., SMITH AJ. & PENNINGTON RJT. 1983. Purification and characterization of the major aminopeptidase from human brain. *J Neurochem* 45: 752-759.
- MANTLE D., LAUFFART B., MCDERMOTT JR., KIDD AM. & PENNINGTON RJT. 1985. Purification and characterization of two soluble Cl activated aminopeptidases hydrolyzing basic termini from human skeletal muscle. *Eur J Biochem* 147: 307-312.
- MANTLE D. 1992. Comparison of soluble aminopeptidases in human cerebral cortex, skeletal muscle and kidney tissues. *Clim Chim Acta* 207: 107-118.
- MARGETTS BM., BEILIN LJ., VANDONGEN R. & ARMSTRONG BK. 1986. Vegetarian diet in mild hypertension: A randomized controlled trial. *Br Med J* 293: 1468-1471.
- MARSH JD., LEHMANN MH., RITCHIE RH., GWATHMEY JK., GREEN GE. & SCHIEBINGER RJ. 1998. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98(3):256-61.
- MARTIN RE. 1998. Docosahexaenoic acid decreases phospholipase A2 activity in the neuritis/nerve growth cones of PC12 cells. *J Neurosci Res* 54: 805-813.
- MARTÍNEZ JM., RAMÍREZ MJ., PRIETO I., ALBA F. & RAMÍREZ M. 1998. Sex differences and in vitro effects of steroids on serum aminopeptidase activities. *Peptides* 19: 1637-1640.
- MASON RP., WALTER MF. & MASON PE. 1997. Effect of oxidative stress on membrane structure: small angle X-ray diffraction analysis. *Free Rad Biol Med* 23: 419-425.
- MATA P., GARRIDO JA., ORDOVAS JM., BLAZQUEZ E., ALVAREZ-SALA LA., RUBIO MJ., ALONSO R. & DE OYA M. 1992. Effect of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women. *Am J Clin Nutr* 56: 77-83.
- MATA P., ALONSO R., LÓPEZ-FARRÉ A., ORDOVAS JM., LAHOZ C., GARCES C., CAMELO C., CODOCEO R., BLAZQUEZ E. & DE OYA M. 1996. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1347-1355.
- MATA P., & ALONSO R. 2001. Bioactive Phenolics in Olive Oil. In: *Bioactive micronutrients in Mediterranean diet and health*. Ed. Amado R, Lairon D., Gerber M, Maiani G, Abt B. European Commission, Brussels. 177-183.
- MATAIX J. 1993. Recent findings in olive oil research. *Eur J Clin Nutr* 47 Suppl 1:S82-4.
- MATSAS R., STEPHENSON SL., HRYSZKO J., KENNY AJ. & TURNER AJ. 1985. The metabolism of neuropeptides: phase separation of synaptic membrane preparations with Triton X-114 reveals the presence of aminopeptidase N. *Biochem J* 231: 445-449.

- MATSUBA H., WATANABE T., WATANABE M., ISHII Y, WAGURI S., KOMINAMI E. & UCHIYAMA Y. 1989. Immunocytochemical localization of prorenin, renin, and cathepsin B, H and L in justaglomerular cells of the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 37: 1689-1697.
- MAZZOLAI L., NUSSBERGER J., AUBERT J., BRUNNER D., GABBIANI G., BRUNNER H. & PEDRAZZINI T. 1998. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension* 31:1324-1330.
- McDERMOTT JR., MANTLE D., LAUFFART B. & KIDD AM. 1985. Purification and characterization of a neuropeptide-degrading aminopeptidase from human brain. *J Neurochem* 45: 752-759.
- McDERMOTT JR., MANTLE D., LAWFORT B., GIBSON AM. & BIGGINS A. 1988. Purification and characterization of two soluble Cl⁻ activated arginyl-aminopeptidases from human brain and their endopeptidase action on neuropeptidases. *J Neurochem* 50: 176-182.
- McDONALD JK., ELLIS S. & REILLY TJ. 1966. Properties of dipeptidyl arylamidase Y of the pituitary. Chloride and sulfhydryl activation of seryltyrosyl-b-naphthylamide hydrolysis. *J Biol Chem* 241: 1494-1501.
- McDONALD JK., ZEITMAN BB. REILLY TJ. & ELLIS S. 1969. New observations on the substrate specificity of capthepsin C (dipeptidyl aminopeptidase Y) including the degradation of gamma-corticotropin and other hormones. *J Biol Chem* 244: 2693-2709.
- McDONALD JK., ZEITMAN BB. & ELLIS S. 1972. Detection of a lysosomal carboxypeptidase and a lysosomal dipeptidase in highly-purified dipeptidyl aminopeptidase Y (cathepsin C) and the elimination of their activities from preparations used to sequence peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 62-70.
- McDONALD JK. & BARRETT AJ. 1986. *Mammalian proteases*. A glossary and bibliography.. Exopeptidases. Academic Press, volumen 1-2.
- McDONALD BE. GERRARD JM. BRUCE VM. & CORNER EJ. 1989. Comparison of the effect of canola oil and sunflower oil on plasma lipids and lipoproteins on *in vivo* thromboxane A₂ and prostacyclin production in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 50: 1382-1388.
- McGEE CD., GREENWOOD CE. & CINADER B. 1994. Dietary fat composition and age affect synaptosomal and retinal phospholipid fatty acid composition in C57BL/6 mice. *Lipids* 29(9): 605-610.
- McGREGOR L., MORAZAIN R. & RENAUD S. 1981. Platelet functions and fatty acid composition of platelet phospholipids in spontaneously hypertensive rats fed saturated or polyunsaturated fats. *Atherosclerosis* 38: 129-136.

- McINTYRE TM. & CURTHOYS NP. 1982. Renal catabolism of glutathione: characterization of a particulate rat renal dipeptidase that catalyzes the hydrolysis of cysteinylglycine. *J Biol Chem* 257: 11915-11921.
- McLENNAN PL. & DALLIMORE JA. 1995. Dietary canola oil modifies myocardial fatty acids and inhibits cardiac arrhythmias in rats. *J Nutr* 125(4):1003-9.
- MEIKLE AW, STRINGHAM JD, WOODWARD MG & MCMURRY MP. 1990. Effects of a fat-containing meal on sex hormones in men. *Metabolism* 39:943-6.
- MENDELSON ME. & KARAS RH. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New Engl J Med* 340:1801-11.
- MENSINK RP., JANSSEN MC. & KATAN MB. 1988. Effect on blood pressure of two diets differing in total fat but not in saturated and polyunsaturated fatty acids in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 47: 976-980.
- MENSINK RP., ZOCK PL., KATAN MB. & HORNSTRA G. 1992. Effect of dietary *cis-and trans*-fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans. *J Lipid Res* 33: 1493-1501.
- MENSINK RP, & KATAN MB. 1992. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Tromb* 12, 911-919.
- MERVAALA E, MÜLLER D, SCHMIDT F, PARK J, BADER M, BREU V, GANTEN D, HALLER H, & LUFT FC. 2000. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 35:587-594.
- MILLER VM. & VANHOUTTE PM. 1991. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *Am J Physiol* 261:R1022-7.
- MITROPOULOS KA., MILLER GJ., MARTIN JC., REEVES BA., & COOPER J. 1994. Dietary fat induces changes in factor VII coagulant activity through effects on plasma free stearic acid concentration. *Arterioscler Thromb* 14: 214-222.
- MIYAJIMA T., TSUJINO T., SAITO K., & YOKOYAMA M. 2001. Effects of eicosapentaenoic acid on blood pressure, cell membrane fatty acids, and intracellular sodium concentration in essential hypertension. *Hypertens Res* 24: 537-542.
- MIZUTANI S., YOSHINO M. & OYA M. 1976. Placental and non-placental leucine aminopeptidases during normal pregnancy. *Clin Biochem* 9: 16-18.
- MIZUTANI S., AKIYAMA H., KURAUCHI O., TAIRA H., NARITA O. & TOMODA Y. 1985. Plasma angiotensin I and serum placental leucine aminopeptidase (P-LAP) in pre-eclampsia. *Arch Gynecol* 236: 165-172.
- MIZUTANI S.,GOTO K., TSUJIMOTO M. & TOMODA Y. 1996. Possible effects of placental aminopeptidase on the regulation of brain-gut hormones in the fetoplacental unit. *Biol Neonate* 69: 307-317.
- MOE O, UJIIIE K, STAR R, MILLER R, WIDELL J, ALPERN R, & HENRICH W. 1993. Renin expression in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 91:774-779

- MOGENSEN GJ. & BOX BM. 1982. Physiological effects of varying dietary linoleic acid in spontaneously hypertensive rats. *Ann Nutr Metab* 26: 232-239.
- MONTAGNE, J., LADRAM, A., NICOLAS, P. & BULANT, M. 1999. Cloning of thyrotropin-releasing hormone precursor and receptor in rat thymus, adrenal gland, and testis. *Endocrinology* 140, 1054-1059.
- MOREY AK., RAZANDI M., PEDRAM A., HU RM., PRINS BA. & LEVIN ER. 1998. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochem J* 330 (Pt 3):1097-105.
- MORI TA., BAO DQ., BURKE V., PUDDEY IB. & BEILIN LJ. 1999. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* 34: 253-260.
- MUDGE AW. & FELLOWS RE. 1973. Bovine pituitary pyrrolidone-carboxyl peptidase. *Endocrinology* 93: 1428-1434.
- MÜLLER DN., HILGERS K., BOHLENDER J., LIPPOLDT A., WAGNER J., FISCHLI W., GANTEN D., MANN J., & LUFT FC. 1995. Effects of human renin in the vasculature of rats transgenic for human angiotensinogen. *Hypertension* 26:272-278.
- MÜLLER DN., BOHLENDER J., HILGERS KF., DRAGUN D., COSTEROUSS O., MENARD J., & LUFT FC. 1997. Vascular expression of the angiotensin converting enzyme gene regulates the rate of local angiotensin II formation. *Hypertension* 29:98-104.
- MÜLLER D., FISCHLI W., CLOZEL J., HILGERS K., BOHLENDER J., MENARD J., BUSJAHN A., GANTEN D. & LUFT F. 1998. Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake. *Circ Res* 82:13-20.
- MULLINS J, PETERS J, & GANTEN D. 1990. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 344:541-544
- MURIANA FJG., RUIZ-GUTIERREZ V. & VAZQUEZ CM. 1992. Influence of dietary cholesterol on polyunsaturated fatty acid composition, fluidity and membrane-bound enzymes in liver microsomes of rats fed olive and fish oil. *Biochimie* 74:551-6.
- MURPHY TJ., ALEXANDER RW., GRIENGLING KK., RUNGE MS. & BERNSTEIN KE. 1991. Isolation of a cDNA encoding the fascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236.
- MURPHY TJ., TAKEUCHI K. & ALEXANDER RW. 1992. Molecular cloning of AT1 angiotensin receptors. *Am J Hypertens* 5: 236S-242.
- MUKOYAMA M., NAKAJIMA M., HORIUCHI M., SASAMURA H., PRATT R.E. & DZAU V.J. 1993. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 268: 24539-24542.
- NADAUD S., HOUOT A.M., HUBERT C., CORVOL P. & SOUBRIER F. 1992. Functional study of the germinal angiotensin I-converting enzyme promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 134-140.

- NAGANO M., HIGAKI J., MIKAMI H., NAKAMARU M., HIGASHIMORI K., KATAHIRA K., TABUCHI Y., MORIGUCHI A., NAKAMURA F. & OGIHARA T. 1991. Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 9:595-599.
- NAGATA C, TAKATSUKA N, KAWAKAMI N & SHIMIZU H. 2000. Relationships between types of fat consumed and serum estrogen and androgen concentrations in Japanese men. *Nutr Cancer* 38:163-7.
- NAGATSU L., GILLESPIE L., FOLK JE. & GLENNER GG. 1965. Serum aminopeptidases, "angiotensinase", and hypertension. I. Degradation of angiotensin II by human serum. *Biochem Pharmacol* 14: 721-728.
- NAGATSU Y., NAGATSU T., YAMAMOTO T., GLENNER GG. & MEHL JW. 1970. Purification of aminopeptidase A in human serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. *Biochim Biophys Acta* 198: 255-270.
- NAHMIAS C. & STROSBURG A.D. 1995. The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *TIPS* 16: 223-225.
- NAIR SS., LEITCH JW., FALCONER J. & GARG ML. 1997. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J Nutr* 127(3):383-93.
- NARUKI M., MIZUTANI S., YAMADA R., ITAKURA A. & TOMODA Y. 1995. Changes in maternal oxytocinase activities in preterm labour. *Med Sci Res* 23: 797-802.
- NAVAR L, HARRISON BERNARD L, IMIG J, WANG C, CERVENKA L, & MITCHELL K. 1999. Intrarenal angiotensin II generation and renal effects of AT (1) receptor blockade. *J Am Soc Nephrol* 10:S266-S272
- NEUTEL JM., SMITH DH., & WEBER MA. 1999. Is high blood pressure a late manifestation of the hypertension syndrome? *Am J Hypertens* 12: 215-223.
- NICKENIG G, BAUMER AT, GROHE C, KAHLERT S, STREHLOW K, ROSENKRANZ S, STABLEIN A, BECKERS F, SMITS JF, DAEMEN J, VETTER H & BOHM M. 1998. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 97(22):2197-201.
- NIELSEN AH., & POULSEN K. 1988. Evidence for a predominant renal secretion and clearance of inactive plasma renin, studied by in vivo inhibition of protein synthesis. *J Hypertens* 6: 129-137.
- NIH CONSENSUS CONFERENCE. 1993. Triglyceride, high-density lipoprotein, and coronary heart disease. NIH Consensus Development Panel on Triglyceride. *J Am Med Assoc* 269(4): 505-10
- NORDWIG A. & MAYER H. 1973. The cleavage of prolyl peptides by kidney peptidases. Detection of a new peptidase capable of removing N-terminal Proline. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 354: 380-383.
- O'CONNOR B. & CUINN G. 1984. Localization of a narrow specificity thioliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 144: 271-278.

- O'CONNOR B. & CUINN G. 1985. Purification of and kinetic studies on a synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 150: 47-52.
- O'CUINN G., O'CONNOR B. & ELMORE M. 1990. Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J Neurochem* 54: 1-13.
- OKUYAMA H., KOBAYASHI T. & WATANABE S. 1996. Dietary fatty acids—the N-6/N-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative N-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog Lipid Res* 35(4):409-57.
- OLIVER WJ., & GROSS F. 1966. Unique specificity of mouse angiotensinogen to homologous renin. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 923-926.
- O'MAHONY, OA., DJAHANBAHKCH, O., MAHMOOD, T., PUDDEFOOT, JR. & VINSON GP. 2000. Angiotensin II in human seminal fluid. *Hum Reprod* 15, 1345-1349.
- ORLOWSKI M. & MEISTER A. 1965. Isolation of gamma-gglutamyl transpeptidase from pig kidney. *J Biol Chem* 240: 338-347.
- OSTERRIEDER W., MULLER RK. & POWEL JS. 1991. Role of angiotensin II in injury-induced neointima formation in rats. *Hypertension* 18: II60-II64.
- PAQUET JL., BAUDOIN-LEGROS M., BRUNELLE G., & MEYER P. 1990. Angiotensin II induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hipertensive rats. *J Hipert* 8: 565-572.
- PARTHASARATHY S., KHOO JC., MILLER E., BARNETT J., WITZTUM JL. & STEINBERG D. 1990. Low density lipoprotein rich in oleic acid is prptected against oxidative modification: Implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3894-3898.
- PASQUALINI C, LEVIEL V, GUIBERT B, FAUCON-BIGUET N & KERDELHUI B. 1991. Inhibitory action of acuteestradiol treatment on the activity and quantity of tyrosine hydroxylase in the median eminence of ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol* 3:575-80.
- PATTERSON EK., HSIAO SH. & KEPPLER A. 1963. Studies on dipeptidases and aminopeptidases I. Sinstinction between leucin aminopeptidase and enzymes thar hydrolyze L-Leucin-2-naphtylamide. *J Biol Chem* 238: 3611-3620.
- PEACH HJ. 1971. Adrenal medullary stimulation induced by angiotensin I, angiotensin II and analogues. *Circ Res* 28: (Suppl.2) 107-117.
- PFEFFER MA. 1992. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 327: 669-677.
- PFEFFER MA. 1995. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Ann Rev Med* 46:455-456.
- PHILLIPS MI., SPEAKMAN EA. & KIMURA B. 1993. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 43: 1-20.

- PICKERING T. 1964. Systemic arterial hypertension. In: Fishman P, Richards D (eds) *Circulation of the blood: men and ideas*. American Physiological Society Publication, Bethesda.
- PITT B., POOLE-WILSON P., SEGAL R., MARTINEZ F., DICKSTEIN K., CAMM A., KONSTAM M., RIEGGER G., KLINGER G., NEATON J., SHARMA D. & THIYAGARAJAN B. 2000. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial-the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355:1582-1587.
- PONCE G., CHARLI J.L., PASTEN J.A., ACEVES C. & JOSEPH-BRAVO P. 1988. Tissue-specific regulation of pyroglutamate amino peptidase activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinol* 48: 211-213.
- POWELL JS., CLOZEL JP., MÜLLER RKM., KUHN H., HEFTI F., HOSANG M. & BAUMGARTNER HR. 1989. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245: 186-188.
- PRIETO I., MARTINEZ JM., HERMOSO F., RAMIREZ MJ., VARGAS F., DE GASPARO M., ALBA F., & RAMIREZ M. 2000. Oral administration of losartan influences aminopeptidase activity in the frontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol* 10(4):279-82.
- PRIETO I., ARECHAGA G., SEGARRA AB., ALBA F., DE GASPARO M. & RAMIREZ M. 2002. Effects of dehydration on renal aminopeptidase activities in adult male and female rats. *Regul Pept* 106:27-32.
- PRIETO I., HERMOSO F., DE GASPARO M., VARGAS F., ALBA F., SEGARRA AB., BANEGAS I. & RAMIREZ M. 2003. Angiotensinase activity in the kidney of renovascular hypertensive rats. *Peptides* 24: 755-760.
- QUAN A, & BAUM M. 1996. Endogenous production of angiotensin II modulates rat proximal tubule transport. *J Clin Invest* 97:2878-2882
- RAMÍREZ M., ARECHAGA G., SÁNCHEZ B., OZAITA A. & LARDELLI P. 1993. Developmental and ageing changes in aminopeptidase activities in selected tissues of the rat. *Experientia* 49: 300-303.
- RAMÍREZ M., DAVIDSON EA., LUTTENAUER L., ELENA PP., CUMIN F., MATHIS GA. & DE GASPARO M. 1996. The renin-Angiotensin System in the Rabbit Eye. *J Ocular Pharmacol* 3: 299-312.
- RAMIREZ M., PRIETO I., MARTINEZ JM., VARGAS F., & ALBA F. 1997. Renal aminopeptidase activities in animal models of hypertension. *Regul Pept* 31;72(2-3):155-9
- RAMIREZ MJ., MARTINEZ JM., PRIETO I., ALBA F., & RAMIREZ M. 1999. Lateralization of aminopeptidase A activity in substantia nigra, striatum and frontal cortex of rats. *Neuropeptides* 33(2):155-8.
- RAMÍREZ-EXPÓSITO MJ., MARTÍNEZ JM., PRIETO I., ALBA F. & RAMÍREZ M. 2000. Comparative distribution of Glutamyl and Aspartyl aminopeptidase activities in mouse organs. *Horm Metab Res* 32: 161-163.

- RAMÍREZ-EXPÓSITO MJ., MARTÍNEZ-MARTOS JM., PRIETO I., ALBA F. & RAMÍREZ M. 2001. Angiotensinase activity in mice fed an olive oil-supplemented diet. *Peptides* 22, 945-952.
- REAUX A., FOURNIE-ZALUSKI M., DAVID C., ZINI S., ROQUES B., CORVOL P. & LLORENS-CORTES C. 1999. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13415-13420.
- REAUX A, FOURNIE-ZALUSKI MC, & LLORENS-CORTES C. 2001. Angiotensin III: a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab* 12(4):157-62.
- RECKELHOFF JF. & GRANGER JP. 1999. Role of androgens in mediating hypertension and renal injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:127-31.
- RECKELHOFF JF. 2001. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 37:1199-208.
- REED D., MCGEE D., YANO K. & HANKIN J. 1985. Diet, blood pressure and multicollinearity. *Hypertension* 1:405-410.
- REED MJ., CHENG RW., SIMMONDS M., RICHMOND W. & JAMES VH. 1987. Dietary lipids: an additional regulator of plasma levels of sex hormone binding globuline. *J Clin Endocrinol Metab* 64:1083-5.
- RIBEIRO MO., ANTUNES E., DE NUCCI G., LOVISOLO SM. & ZATZ R. 1992. Chronic inhibition of nicric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20: 298-303.
- RICH DH., MOON BJ & HARBESON S. 1984. Inhibition of aminopeptidases by amastatin and bestatin derevatives, effect of inhibitor structure on slow-binding processes, *J Med Chem* 27: 417-422.
- RIEMERSMA RA., WOOD DA., BUTLER S., ELTON RA., OLIVER M., SALO M., NIKKARI T., VARTIAINEN E., PUSKA P. & GEY F. 1986. Linoleic acid content in adipose tissue and coronary heart disease. *Br Med J* 292(6533): 1423-1427.
- RINNE A., KIRSCHKE H., JÄRVINEN M. HOPUSU-HAVU VK., WIEDERANDERS B. & BOHLEY P. 1985. Localization of cathepsin H and its inhibitors in the skin and other stratified epithelia. *Arch Dermatol Res* 277: 190-194.
- ROBINSON DE., BIRNBAUM SM. & GREENSTEIN JP. 1953. Purification and properties of an aminopeptidase from kidney cellular particulates. *J Biol Chem* 207: 1-26.
- ROBINSON RS., PUSHPAKUMARA PG., CHENG Z., PETERS AR., ABAYASEKARA DR. & WATHES DC. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction* 124:119-31.
- RODRIGUEZ-ALEMAN F. TORRES JM., CUADROS JL., RUIZ E. & ORTEGA E. 2000. Effect of estrogen-progestin replacement therapy in plasma lipids and proteins in postmenopausal women. *Endocrinol Res* 26: 263-273.
- ROGI T., TSUJIMOTO M., NAKAZATO H., MIZUTANI S. & TOMODA Y. 1996. Human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase: a new member of type II membrane-spanning zinc metallopeptidase family. *J Biol Chem* 271: 3328-3332.

- ROUSE IL., ARMSTRONG BK. & BEILIN LV. 1983. The relationship of blood pressure to diet and lifestyle in two religious populations. *J Hypertens* 1: 65-71.
- RUBBA P., MANCINI M., FIDANZA F., GAUTIERO G., SALO M., NIKKARI T., ELTON R. & OLIVER M.F. 1987. Adipose tissue, fatty acids and blood pressure in middle aged men from southern Italy. *Int J Epidemiol* 16: 528-531.
- SACKS FM., ROSNER B., & KASS EH. 1974. Blood pressure in vegetarians. *Am J Epidemiol* 100: 390-398.
- SACKS FM., STAMPFER MJ., MUNOZ A., MCMANUS K., CANESSA M., & KASS EH. 1987. Effect of linoleic and oleic acids on blood pressure, blood viscosity, and erythrocyte cation transport. *J Am Coll Nutr* 6: 179-185.
- SACKS FM. 1989. Dietary fats and blood pressure: A critical review of the evidence. *Nutr Rev* 47: 291-299.
- SACKS FM. 1994. Dietary fats and coronary heart disease. Overview. *J Cardiovasc Risk* 1: 3-8.
- SACKS FM. 2002 Dietary fat, the Mediterranean diet, and health: reports from scientific exchanges, 1998 and 2000. Introduction. *Am J Med* 30;113 Suppl 9B:1S-4S.
- SAKURA H., LIN T.Y., DOY MM., MIZUTANI S. & KAWASHIMA Y. 1981. Purification and properties of oxytocinase a metalloenzyme. *Biochem Int* 2: 173-179.
- SAKURA H., KOBAYASHI H., MIUTANI S., SAKURA N., HASHIMOTO T. & KAWASHIMA Y. 1983. Kinetic properties of placental aminopeptidase A: N-terminal degradation of angiotensin II. *Biochem Int* 6: 609-615.
- SALONEN JT., TUOMILEHTO J., & TANSKANEN A. 1983. Relation of blood pressure to reported intake of salt, saturated fats and alcohol in healthy middle-aged population. *J Epidemiol Community Health* 37: 32-37.
- SALONEN JT., SALONEN R., IHANAINEN M., PARVIAINEN M., SEPPANEN R., KANTOLA M., SAPPANEN K. & RAURAMAA R. 1988. Blood pressure, dietary fats and antioxidants. *Am J Clin Nutr* 48: 1226-1232.
- SANDERS TA. & ROSHANAI F. 1983. The influence of different types of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin Sci* 64(1): 91-99.
- SASAKI K., YAMANO Y., BARDHAN S., IWAI N., MURRAY J.J., HASEGAWA M., MATSUDA Y. & INAGANI T. 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type 1 receptor. *Nature* 351: 233-236.
- SAWA H., TOKUCHI F., MOCHIZUKI N., ENDO Y., FURUTA Y., SHINOHARA T., TAKADA A., KAWAGUCHI H., YASUDA H. & NAGASHIMA K. 1992. Expression of the angiotensinogen gene and localization of its protein in the human heart. *Circulation* 86:138-146.
- SCHIFFRIN EL. 1998. *Remodelado vascular en la hipertensión vascular, su importancia en la clínica. Lo nuevo y lo importante en la hipertensión.* Boletín del Consejo Argentino de Hipertensión arterial, Sociedad Argentina de Cardiología, año 1, nº2, pp: 4-5.

- SCHOMBURG L. & BAUER K. 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136 (8): 3480-3485.
- SCHULZ W, HAGLER H, BUJA L, & ERDOS E. 1988. Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Lab Invest* 59:789-797
- SCHUNKERT H., INGELFINGER JR., JACOBS H., JACKSON B., BOUYOUNES B. & DZAU V.J. 1992. Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II. *Am J Physiol* 263: E863-E869.
- SCHUNKERT H., DANSER AH., HENSE HW., DERKX FH., KURZINGER S. & RIEGGER GA. 1997. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation* 95(1):39-45.
- SCHWABE, C. & MCDONALD, JK. 1977. Demonstration of a pyroglutamyl residue at the N-terminus of the B-chain of porcine relaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 74, 1501-1504.
- SCHWARTZ WN. & BARRET AJ. 1980. Human cathepsin H. *Biochem J* 191: 487-497.
- SEALY JE., & RUBATTU S. 1989. Prorenin and renin as separate mediators of tissue and circulating systems. *Am J Hypertens* 2: 358-366.
- SEBOKOVA E., GARG ML. & CLANDININ MT. 1988. Modulation of receptor-mediated gonadotropin action in rat testes by dietary fat. *Am J Physiol* 254:E708-12.
- SEBOKOVA E., GARG ML., WIERZBICKI A., THOMSON AB. & CLANDININ MT. 1990. Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of Leydig cells and testosterone synthesis. *J Nutr* 120:610-8
- SECHI L., GRIFFIN C., GRADY E., KALINYAK J. & SCHAMBELAN M. 1992. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res* 71:1482-1489.
- SHAI SY., LANGFORD KG., MARTIN BM. & BERNSTEIN KE. 1990. Genomic DNA 5' to the mouse and human angiotensin I converting enzyme genes contains two distinct regions of conserved sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 167: 1128-1133.
- SHARMA KK. & ORTWERTH BJ. 1986. Isolation and characterization of a new aminopeptidase from bovine lens. *J Biol Chem* 261: 4295-4301.
- SHARPE RM. 1986. Paracrine control of the testis. *Clin Endocrinol Metab* 15, 185-207.
- SHI ZX., XU W., MERGNER WJ., LI QL., COLE KH. & WILBER JF. 1996. Localization of thyrotropin-releasing hormone mRNA expression in the rat heart by in situ hybridization histochemistry. *Pathobiology* 64(6):314-9.

- SHIKANO M., MASUZAWA Y. & YAZAWA K. 1993. Effect of docosahexaenoic acid on the generation of platelet-activating factor by eosinophilic leukemia cells Eo1-1. *J Immunol* 15(150): 3525-3533.
- SHIMAMURA T. & WILSON A.C. 1991. Influence of dietary fish oil on aortic, myocardial and renal lesions of SHR. *J Nutr Sci Vitaminol* 37: 581-590.
- SHIMOKAWA H., LAM JYT., CHESEBRO JH., BOWIE EJW. & VANHOUTTE PM. 1987. Effects of dietary supplementation with cod-liver oil on endothelium-dependent response in porcine coronary arteries. *Circulation* 76: 898-905.
- SIAMOPOULOS KC., PAPANIKOLAOU S., ELISAF M., THEODOROU J., PAPPAS H. & PAPANIKOLAOU N. 1996. Ambulatory blood pressure monitoring in normotensive pregnant women. *J Hum Hypertens* 10 Suppl 3:S51-4.
- SIHM I., SCHROEDER AP., AALKJAER MH., HOLM M., MORN B., MULVANY M., THYGESEN K. & LEDERBALLE O. 1995. The relation between peripheral vascular structure, left ventricular hypertrophy and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Am J Hypertens* 8: 987-996.
- SIM MK. 1993. Degradation of angiotensin I in the endothelium and smooth muscle of the rat aorta. *Biochem Pharmacol* 45: 1524-1527.
- SIM MK. & QIU XS. 1994. Formation of des-Asp-angiotensin I in the hypothalamic extract of normo- and hypertensive rats. *Blood Pressure* 3: 260-264.
- SIM, MK., CHOO, MH. & QIU, XS. 1994. Degradation of angiotensin I to [des-Asp1] angiotensin I by a novel aminopeptidase in the rat hypothalamus. *Biochem Pharmacol* 48, 1043-1046.
- SINGER P., MORITZ V., WIRTH M., BERGER I. & FORSTER D. 1990. Blood pressure and serum lipids from SHR after diets supplemented with evening primrose, sunflower seed or fish oil. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 40: 17-20.
- SINGH H. & KALNITSKY G. 1980. a-N-benzoylarginine- β -naphthylamide hydrolase, an aminoendopeptidase from rabbit lung. *J Biol Chem* 255 (2): 369-374.
- SIRTORI CR. 1998. Evaluation of lipoproteins/apolipoproteins as therapeutic agents for the treatment of vascular and nonvascular disease. *Am J Cardiol* 81(8A):36F-39F.
- SKEGGS LT., KAHN JR. & SHUMWAY NP. 1956. The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. *J Exp Med* 103: 295-299.
- SKEGGS L, DORER F, KAHN J, LENTZ K, & LEVINE M. 1976. The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med* 60:737-748
- SMALL CW. & WATKINS WB. 1975. Oxytocinase immunohistochemical demonstration in the immature and term human placenta. *Cell Tiss Res* 162: 531-539.
- SMITH-BARBARO P., FISHER H., QUINN MR. & HEGSTED DM. 1980. The effect of varying polyunsaturated to saturated fat ratios on salt induced hypertension in rats. *Nutr Rep Int* 22: 759-770.

- SMYTH M. & O'CUINN G. 1994.—Alanine aminopeptidase of guinea pig brain: a broad specificity cytoplasmic enzyme capable of hydrolysing short and intermediate length peptides. *Int J Biochem* 26: 1287-1297.
- SODERBERG C., GIUGNI T.D., ZAIA JA. LARSSON S., WAHLBERG JM. & MOLLER E. 1993. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection.—*J Virol* 67: 6576-6585.
- SÖDERLING E. & MÄKINEN KK. 1983. Modification of the Cl-activated arginine aminopeptidase from rat liver and human erythrocytes: a comparative study. *Arch Biochem Biophys* 220: 1-10.
- SÖDERLING E. 1983. Substrates specificities of the Cl-activated arginine aminopeptidase B from human and rat origin. *Arch Biochem Biophys* 220: 1-10.
- SOLHONNE B., GROS C., POLLARD H. & SCHWARTZ J-C. 1987. Major localization of aminopeptidase M in rat brain. *Neuroscience* 22: 225-232.
- SONG LJ., WILK E., WILK S. & HEALY DP. 1993. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. I. Association with cerebral microvessels. *Brain Res* 606: 286-294.
- SONG LJ. & YE MQ. 1994. Characterization of rat kidney glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase-A): molecular identity and cellular localization. *Am J Physiol* 267: F546-F557.
- SOUBRIER F., ALHENC-GELAS F., HUBERT C., ALLEGRINI J., TREGGAR G. & CORVOL P. 1988. Two putative active center in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9386-9390.
- SPACKMAN DH., SMITH EL. & BROWN DM. 1955. Leucine aminopeptidase IV. Isolation and properties of the enzyme from swine Kidney. *J Biol Chem* 212: 25-269.
- SPECK G., POULSEN K., UNGER T., RETTIG R., BAYER C., SCHOLKENS B. & GANTEN D. 1981. In vivo activity of purified mouse brain renin. *Brain Res* 219:371-384.
- SPETH RC. & HARIK SE. 1985. Angiotensin II receptor bounding sites in brain microvesels. *Proc Nat Acad Sci* 82: 6340-6343.
- SPETH RC., DAUBERT DL. & GROVE KL. 1999. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept* 79, 25-40.
- STAESSEN JA., GINNOCHIO G., THIJS L. & FAGARD R. 1997. Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study. *J Hum Hypertens* 11:507-14.
- STRAWN WB., CHAPPELL MC., DEAN RH., KIVLIGHN S. & FERRARIO CM. 2000. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet induced atherosclerosis. *Circulation* 101: 54-62.
- STRITTMATTER S. & SNYDER S. (1987) Angiotensin converting enzyme immunohistochemistry in rat brain and pituitary gland: correlation of isozyme type with cellular localization. *Neuroscience* 21:407-420.

- SUEN CS. & WILK S. 1989. Regulation of thyrotropin releasing hormone degrading enzymes in rat brain and pituitary by L-3,5,3'-triiodothyronine. *J Neurochem* 52: 884-888.
- SUMINO H, ICHIKAWA S, KANDA T, SAKAMAKI T, NAKAMURA T, SATO K, KOBAYASHI I & NAGAI R. 1999. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with essential hypertension increases circulating plasma levels of bradykinin. *Am J Hypertens* 12(10 Pt 1):1044-7.
- SURAI PF., NOBLE RC., SPARKS NH. & SPEAKE BK. 2000. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. *J Reprod Fertil* 120:257-64.
- SUZUKI H., PARK SJ., TAMURA M. & ANDO S. 1998. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech Ageing Dev* 16(101): 119-128.
- SWANSON G., HANESWORTH J., SARDINIA M., COLEMAN J., WRIGHT J., HALL K., MILLER-WING A., STOBBS J., COOK V. & HARDING E. 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 40:409-419.
- SWANSON GN. 1992. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (38) a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 40: 409-419.
- SWENSON KL. & SLADEN CD. 1997. Gonadal steroid modulation of vasopressin secretion in response to osmotic stimulation. *Endocrinology* 138:2089-97.
- TAYLOR A. 1996. Aminopeptidase: structure and function. *FASEB J.* 7: 290-298.
- TEMME E., MENSINK RP. & HORNSTRA G. 1996. Comparison of the effects of diets enriched in lauric, palmitic, or oleic acids on serum lipids and lipoproteins in healthy women and men. *Am J Clin Nutr* 63: 897-903.
- TIEKU S. & HOOPER NM. 1992. Inhibition of aminopeptidases N and A re-evaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochem Pharmacol* 44: 1725-1730.
- THURMANN PA. 1999. Angiotensin II antagonism and the heart: valsartan in left ventricular hypertrophy. *Cardiology* 91 Suppl 1:3-7.
- TINOCO J. 1982. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. *Prog Lipid Res* 21: 1-45.
- TIROSH O., KOHEN R., KATZHENDLER J., ALON A. & BARENHOLZ Y. 1997. Oxidative stress effect in the integrity of lipid bilayers is modulated by cholesterol level of bilayers. *Chem Phys Lipids* 87: 17-22.
- TOBE H., KOJIMA F., AOYAGI T. & UMEZAWA H. 1980. Purification using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim Biophys Acta* 613, 459-468.

- TOBIAN L., GANGULI M., JOHNSON MA. & IWAI J. 1982. Influence of renal prostaglandins and dietary linoleate on hypertension in Dahl S rats. *Hypertension* 11 (Suppl. II): 149-153.
- TOBLER AR., CONSTAM DB., SCHMITT-GRAFT A., MALIPIERO U., SCHLAPBACH R. & FONTANA A. 1997. Cloning of the human puromycin-sensitive aminopeptidase and evidence for expression in neurons. *J Neurochem* 68: 889-897.
- TROLLIET M. & PHILLIPS M. 1992. The effect of chronic bilateral nephrectomy on plasma and brain angiotensin. *J Hypertens* 10:29-36.
- TSUJIMOTO M., MIZUTANI S., ADACHI H., KIMURA H. & TOMODA Y. 1992. Identification of human placental leucine aminopeptidase as oxytocinase. *Arch Biochem Biophys* 292: 388-392.
- TSUKAHARA T., ISHIURA S. & SUGITA H. 1988. The ATP-dependent protease in human erythro leukemia (K562) cells is identical to a high-molecular mass protease ingensin. *Proc Japan Acad* 64: 72-75.
- TUPPY H. & NESBADYA H. 1957. The aminopeptidase activity of serum in pregnancy and its relationship to the potential for inactivating oxytocin. *Monatsh Chem* 88: 977-988.
- ULBRICHT TLV. & SOUTHGATE DAT. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338: 985-992.
- UMEZAWA H., AOYAGI T., SUDA H., HAMADO M & TAKEUCHI T. 1976. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J Antibiot* 29: 97-99.
- UNGER T., BADOER E., GANTEN D., LANG RE. & RETTIG R. 1988 Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation* 77: (Suppl I) 40-54.
- UNGER T., CHUNG O., SCIKOS T., CULMAN J., GALLINAT S., GOHLKE P., HOHLE S., MEFFERT S., STOLL M., STROTH U. & ZHU YZ. 1996. Angiotensin receptors. *J Hypertens* Suppl 14: S95-103.
- URATA H., KINOSHITA A., MISONO K., BUMPUS F. & HUSAIN A. 1990. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 265:22348-22357.
- URATA H., STROBEL F. & GANTEN D. 1994. Widespread distribution of human chymase. *J Hypertens* 12: S17-S22.
- VAN LEEUWEN RT., KOL A., ANDREOTTI F., KLUFT C., MASERI A. & SPERTI G. 1994. Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor type I and tissue type plasminogen messenger RNA in cultured aortic rat smooth muscle cells. *Circulation* 90:362-368.
- VINSON GP., PUDDEFOOT J.R., HO M.M., BARKER S., MEHTA J., SARIDOGAN E. & DJAHANBAKHCH O. 1995. Type 1 angiotensin II receptors in rat and human sperm. *J Endocrinol* 144, 369-378.
- VISWANATHAN M., STRÖMBERG C., SELTZER A. & SAAVEDRA JM. 1992. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptors in neointima of rat aorta. *J Clin Invest* 90: 1707-1712.

- VOGEL LK., NORÉN O. & SIÖSTRÖM H. 1992. The apical sorting signal on human aminopeptidase N is not located in the stalk but in the catalytic head group. *FEBS Lett.* 308: 14-17.
- VOLEK JS., GOMEZ AL., LOVE DM., AVERY NG., SHARMAN MJ. & KRAEMER WJ. 2001. Effects of a high-fat diet on postabsorptive and postprandial testosterone responses to a fat-rich meal. *Metabolism* 50:1351-5.
- VON HOUWELINGEN R., NORDOY A., VAN DER BEEK E., HOUTSMULLER U., DE METZ M., & HORNSTRA G. 1987. Effect of a moderate fish intake on blood pressure, bleeding time, hematology, and clinical chemistry in healthy males. *Am J Clin Nutr* 46(3):424-36.
- VON LUTEROTTI N., CATANZARO DF., SEALY JE. & LARAGH JH. 1994. Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. *Circulation* 89: 458-470.
- VONGPATANASIN W., TUNCEL M. & MANSOUR Y. 2001. Transdermal estrogen replacement therapy decreases sympathetic activity in postmenopausal women. *Circulation* 103:2903-8.
- WANG T. & GIEBISCH G. 1996. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol* 271:F143-F149
- WARD PE., BENTER IF., DICK L. & WILK S. 1990. Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M. *Biochem Pharmacol* 40: 1725-1732.
- WEISINGER HS., VINGRYS AJ. & SINCLAIR AJ. 1995. Dietary manipulation of long-chain polyunsaturated fatty acids in the retina and brain of guinea pigs. *Lipids* 30(5): 471-473.
- WHITE RE., DARKOW DJ. & LANG JLF. 1995. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ Res* 77:936-42.
- WILK S. & HAELY DP. 1993. Glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A), the BP-1/6C3 antigen. *Adv Neuroimmunol* 3: 195-207.
- WILK S., WILK E. & MAGNUSSON RP. 1998. Purification, characterization and cloning of a cytosolic aspartyl aminopeptidase. *J Biol Chem* 273: 15961-15970.
- WILLIAMS GH. 1988. Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N Engl J Med* 319: 1517-1525.
- WILLIAMS PT., FORTMANN SP., TERRY RB., GARAY SC., VRANIZAN KM., ELLSWORTH N. & WOOD PD. 1987. Associations of dietary fat, regional adiposity and blood pressure in men. *J Am Med Assoc* 257: 3251-3256.
- WITTEMAN JM., WILLETT WC., STAMPFER MJ., COLDITZ GA., SACKS FM., SPEIZER FE., ROSNER B. & HENNEKENS CH. 1989. A prospective study of nutritional factors and hypertension among U.S. women. *Circulation* 80: 1320-1327.
- WITZTUM JL., & STEINBERG D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785-1792.

- WOLF G., KILLEN PD. & NEILSON EG. 1991. Intracellular signalling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul* 2: 219-227.
- WOOLLETT LA., SPADY DK. & DIETSCHY JM. 1992. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J Lipid Res* 33: 77-88.
- WRIGHT JW., AMIR HZ., MURRAY CE., ROBERTS KA., HARDING JW., MIZUTANI S. & WARD PE. 1991. Use of aminopeptidase M as a hypotensive agent in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Bull* 27: 545-551.
- WRIGHT JW. & HARDING JW. 1995. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, At2, And AT4 and their functions. *Regul Pept* 59: 269-295.
- WRIGHT JW., KREBS LT., STOBBS JW. & HARDING JW. 1995. The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 16: 23-52.
- WRIGHT J. & HARDING J. 1997. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev* 25:96-124.
- XIAO S., GILLESPIE DG., BAYLIS C., JACKSON EK. & DUBEY RK. 2001. Effects of estradiol and its metabolites on glomerular endothelial nitric oxide synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension* 37 (Part 2):645-50.
- XU Y., WELLNER D. & SCHEINBERG DA. 1995. Substance P and bradykinin are natural inhibitors of CD13/aminopeptidase N. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 664-674.
- YAMADA M., SUKENAGA Y., FUJII H., ABE F. & TAKEUCHI T. 1994. Purification and characterization of a ubenimex (Bestatin)-sensitive aminopeptidase B-like enzyme from K562 human chronic myeloid leukemia cells. *FEBS Lett.* 342: 53-56.
- YAMADA T., HORIUCHI M. & DZAU V. 1996. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Sci USA* 93: 156-160.
- YAMAMOTO N., OKANIWA Y., MORI S., NOMURA M. & OKUYAMA H. 1991. Effects of high-linoleate and a high alpha-linolenate diet on the learning ability of aged rats. Evidence against an autoxidation-related lipid peroxide theory of aging. *J Gerontol* 46(1): 17-22.
- YAMORI Y., NARA Y., MIZUSHIMA S., MANO M. & HORIE R. 1993. *Dietary risk factors for high blood pressure: main result from WHO-CARDIAC (core) Study.* 3rd International Conference on Preventive Cardiology. No. 190.
- YEAGER CL., ASHMUN RA., WILLIAMS RK., CARDELLICHIO CB., SHAPIRO LH., LOOK AT. & HOLMES KB. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357: 420-422.
- YIN K., CHU ZM. & BEILIN LJ. 1992. Blood pressure and vascular reactivity changes in spontaneously hypertensive rats fed fish oil. *Br J Pharmacol* 102: 991-997.
- Ylikorkala O, Orpana A, Puolakka J, Pyörala T & Viinikka L. 1995. Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3384-7.

- YOSEFY C., VISKOPER JR., LASZT A., PRILUK R., GUITA E., VARON D., ILLAN Z., BERRY EM., SAVION N., ADAN Y., LUGASSY G., SCHNEIDER R. & RAZ A. 1999. The effect of fish oil on hypertension, plasma lipids and hemostasis in hypertensive, obese, dyslipidemic patients with and without diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61(2):83-7.
- YOSHIMOTO T., SHIMODA T., KITAZONO A., KABASHIMA T., ITO K. & TSURU D. 1993. Pyroglutamyl peptidase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*: cloning, sequencing, expresión and crystallization of the expressed enzyme. *J Biochem* 113: 67-73.
- YOU DIN KA. & DEANS SG. 2000. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Brit J Nutr* 83(1):87-93.
- YU S., DERR J., ETHERTON TD., & KRIS-ETHERTON P. 1995. Plasma cholesterol-predictive equations demonstrate that stearic acid is neutral and monounsaturated fatty acids are hypocholesterolemic. *Am J Clin Nutr* 61, 1129-1139.
- ZANCHETTI A. 2001. The antiatherogenic effects of antihypertensive treatment: trials completed and ongoing. *Curr Hypertens Rep* 3: 350-359.
- ZHANG SH., ZHANG YQ. & VACCA-GALLOWAY LL. 1995. Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in the Leydig cells of the mouse testis by in situ hybridization. *Neuropeptides* 29, 309-313.
- ZIMMERMAN B. 1962. Effect of acute sympathectomy on responses to angiotensin and norepinephrine. *Circ Res* 11:780-787.
- ZOCK PL., DE VRIES JH. & KATAN MB. 1994. Impact of myristic acid versus palmitic acid on serum lipid and lipoprotein levels in healthy women and men. *Arterioscl Thromb* 14:567-575.