

Proliferación de células musculares lisas vasculares de ratas intolerantes a la glucosa

ROBERTO M. MIATELLO*, Bioq. CLAUDIA M. CASTRO†, NORMA R. RISLER‡, Lic. MONTSERRAT C. CRUZADO§

RESUMEN

Antecedentes

El síndrome X se caracteriza principalmente por resistencia a la insulina e hipertensión arterial (HTA). El objetivo fue examinar la proliferación de células musculares lisas vasculares (cMLV) en cultivo, obtenidas de arterias de distribución (aorta) y resistencia (mesentérica) de ratas con un modelo experimental de insulinoresistencia (FFR).

Métodos

Ratas Wistar de 30 días fueron divididas en dos grupos: control (C, n = 10) y FFR (n = 10). Las FFR recibieron durante 45 días fructosa al 10% p/v en el agua de bebida. Al final de este período se controló: tolerancia a sobrecarga de glucosa (TSG), presión arterial sistólica (PAS) y peso cardíaco relativo (PCR). Se obtuvieron cMLV de aorta torácica y arcada mesentérica. En pasaje 2 se estudió su respuesta proliferativa frente a suero fetal bovino 10% (SFB 10%) e insulina (100 y 500 μ U/ml), por incorporación de [³H]-timidina (ITT). Se realizó un análisis de saturación para receptores de IGF-1, mediante unión del radioligando [¹²⁵I]-IGF-1.

Resultados

El grupo FFR presentó mayor área bajo la curva de TSG: 1.443 ± 87 versus 1.119 ± 38 mmol/L 120 minutos ($p < 0,01$) y aumentó su PAS $134 \pm 1,3$ versus $113 \pm 1,3$ mm Hg ($p < 0,001$) y PCR $260 \pm 1,1$ versus $248,5 \pm 1,3$ mg corazón/100 g peso corporal ($p < 0,001$). La incorporación de [³H]-timidina en presencia de SFB 10% fue mayor en las cMLV aórticas de FFR: $307,2 \pm 14,7\%$ (n = 6) versus C: $205,5 \pm 23,6\%$ (n = 6) ($p < 0,05$), y en las cMLV mesentéricas: FFR: $739,4 \pm 22,3$ (n = 6) versus C: $286,2 \pm 16,7\%$ (n = 6) ($p < 0,001$). Los grupos no presentaron diferencias en su respuesta a la insulina. Cultivos primarios de cMLV aórtica de FFR presentaron una disminución significativa en el número de receptores para IGF-1 ($p < 0,05$), sin modificación en la afinidad por el ligando.

Conclusiones

El grupo FFR desarrolló intolerancia a la glucosa e HTA con hipertrofia cardíaca. Las cMLV en cultivo mostraron mayor respuesta proliferativa frente a un estímulo inespecífico, como SFB 10%, pero no lo hicieron frente a la insulina, lo cual coincidió con la disminución en el número de receptores para IGF-1. Estas observaciones podrían contribuir a la explicación de los mecanismos involucrados en las alteraciones cardiovasculares asociadas con insulinoresistencia. REV ARGENT CARDIOL 1999; 67: 83-89.

Palabras clave Insulinoresistencia - Hipertensión arterial - Músculo liso vascular - Insulina

INTRODUCCION

La hipertensión arterial (HTA) se asocia con elevada frecuencia con alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono. (1) La agrupación de factores de

riesgo cardiovascular, encabezados por insulinoresistencia y acompañados por hipertensión, alteración en el perfil lipídico y aterosclerosis, constituye la entidad clínica denominada "síndrome X". (2)

Laboratorio de Cultivo Celular, Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza - Argentina

*Doctor en Bioquímica, Universidad Juan Agustín Maza. †Bioquímica, Universidad Nacional de Córdoba. ‡Médica, Universidad Nacional de Cuyo. §Licenciada en Bioquímica, Universidad Nacional de Cuyo.

Trabajo recibido para su publicación: 6/98 Aceptado: 7/98

Dirección para separatas: Dr. Roberto Miatello. Cátedra de Fisiología Patológica - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Cuyo. Av. Libertador 80 (5500) Mendoza, Argentina. E-mail: miatell@fmed2.uncu.edu.ar

La comprensión de los mecanismos involucrados en el aumento de frecuencia de la HTA y alteraciones cardiovasculares en estos pacientes permanece incompleta. Existen evidencias de que la base común para la aparición de HTA en diabéticos estaría dada por alteraciones en la estructura y/o la función vascular, cuya consecuencia sería provocar un aumento en la resistencia vascular periférica. La disfunción endotelial, considerada como causa o consecuencia, se asocia con estas patologías. La posición estratégica de las células endoteliales entre la corriente sanguínea y el músculo liso vascular las convierte en el blanco fundamental de los procesos de injuria originados por los factores de riesgo cardiovascular. (3) Por otra parte, la estimulación del crecimiento y proliferación de las células del músculo liso vascular (cMLV) dentro de la pared vascular se asocia con el inicio y la progresión de este estado patológico. (4)

Se han descrito modelos experimentales de hipertensión asociada con insulinoresistencia en animales, producidos mediante la administración de sobrecarga de fructosa o sacarosa en la dieta, (5-7) que han brindado información importante para la comprensión de los mecanismos bioquímicos involucrados en la alteración de la actividad de la insulina. Se ha demostrado que la administración crónica de fructosa modifica múltiples aspectos del metabolismo de los hidratos de carbono, que causan disminución en la oxidación de glucosa en los tejidos hepático, adiposo y muscular estriado, aumento de gluconeogénesis hepática y disminución de la síntesis de glucógeno hepático. A esto se le suman alteraciones en el metabolismo hepático de los lípidos, caracterizados por aumento en la lipogénesis y producción de triglicéridos. (7, 8)

Nuestro laboratorio describió el efecto de concentraciones variables de insulina sobre la proliferación de cMLV cultivadas de ratas Wistar. (9)

Dado que se demostró que el desarrollo del modelo experimental patológico inducido por administración crónica de fructosa se acompaña de hiperinsulinemia, (7, 8) el objetivo de este trabajo es caracterizar la respuesta de cMLV en cultivos primarios y/o de pasajes iniciales, provenientes de arterias funcionalmente distintas (aorta torácica y lecho vascular mesentérico) de ratas con este modelo.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Los procedimientos se realizaron de acuerdo con lineamientos institucionales para experimentación en animales. Se utilizaron ratas Wistar macho de 30-35 días de edad, que fueron alojadas en bioterio en condiciones de temperatura constante (20°C) y ciclo luz/oscuridad de 12 horas.

Diseño experimental

El conjunto total de animales se dividió aleatoriamente en dos grupos:

a) Experimental (FFR): administración crónica de fructosa en el agua de bebida (10% p/v), *ad libitum*, durante un período de 45 días.

b) Control (C): administración de agua potable.

Parámetros bioquímicos

Se constató la obtención efectiva del modelo de insulinoresistencia a través de pruebas de tolerancia a la sobrecarga de glucosa (TSG) que incluyó la determinación de glucemia basal (método de la glucosa oxidasa peroxidasa) y 30, 60, 90 y 120 minutos después de una sobrecarga de glucosa (2 g/kg ip). Se utilizó el área bajo la curva como estimación de la tolerancia.

Presión arterial

Durante el transcurso del período experimental, la presión arterial sistólica se controló semanalmente mediante el método pletismográfico en la cola de la rata, con registro de las mediciones en un polígrafo Grass Model 7 (Mass., USA), manteniendo a los animales durante los 15 minutos previos y durante la medición en ambiente termostatzado a 37°C.

Peso cardíaco relativo

Con la finalidad de evaluar la aparición de hipertrofia cardíaca, el peso cardíaco relativo se estableció a través de un índice que relaciona el peso cardíaco en mg por cada 100 g de peso corporal total.

Cultivos celulares

Los cultivos se realizaron de acuerdo con la técnica previamente descrita. (9) Brevemente, al final del período experimental, los animales se sacrificaron por decapitación bajo anestesia con éter, se extrajeron asépticamente los vasos arteriales y se colocaron en HBSS frío con la mezcla antibiótica-antimicótica para su disección. Las cMLV aórticas se obtuvieron de 4 o 5 aortas torácicas por digestión enzimática (8) a 37°C con colagenasa (1,0 mg/ml) en MEM F12 - suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células se cultivaron con MEM F12 con SFB al 10% a 37°C en incubador humidificado y presurizado con 5% de CO₂, y se utilizaron cultivos primarios y en pasaje 2. Las cMLV mesentéricas se aislaron por un procedimiento modificado del descrito por Pang, (10) utilizando para cada cultivo primario 5 o 6 arcadas mesentéricas, incluida la arteria mesentérica superior. La digestión se realizó a 37°C en MEM F12 con colagenasa (2,0 mg/ml), elastasa (0,15 mg/ml), albúmina sérica bovina (2,0 mg/ml) e inhibidor de tripsina de soja (0,35 mg/ml). Las células, cultivadas en condiciones similares a las aórticas, se usaron en cultivos primarios y

pasaje 2. Los ensayos de proliferación se realizaron con células de tres cultivos primarios diferentes.

Caracterización de las cMLV

Las células se caracterizaron como células de músculo liso por morfología (patrón característico de crecimiento en *hill and valley* hasta llegar a confluencia, (11) y por tinción positiva con anticuerpos específicos anti-alfa-actina de músculo liso. (12) La ausencia de células endoteliales en los cultivos se comprobó mediante la investigación de factor VIII con anticuerpos antifactor VIII.

Ensayo de proliferación. Incorporación de [³H]-timidina

Las cMLV cultivadas en multiplacas de 24 fosas hasta 80% de confluencia se hicieron aquiescentes por incubación con SFB al 0,1% durante 48 horas y luego fueron estimuladas con SFB al 10% o con insulina (100 y 500 μ U/ml) durante 24 horas, manteniendo un grupo control con SFB 0,1%. La síntesis de ADN se evaluó por la incorporación de [³H]-timidina (1,0 μ Ci/ml) agregada durante las tres últimas horas de incubación. Las células luego fueron lavadas con PBS frío tres veces, incubadas tres veces con ácido tricloroacético al 10%, lavadas dos veces con metanol frío y finalmente se extrajo el material radiactivo con dodecilsulfato de sodio 0,1% y NaOH 0,1 mol/L; el conteo se realizó por triplicado en contador de centelleo líquido. En todos los casos los resultados corresponden a 6 fosas.

Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular fue determinada al fin del tratamiento en todos los grupos, usando la prueba de exclusión con azul tripano. (13)

Ensayo de unión a receptores para factor de crecimiento símil insulina (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1)

Se examinaron cultivos primarios de cMLV aórticas provenientes de los grupos experimental y control mediante un análisis de saturación para receptores de IGF-1, utilizando como radioligando [¹²⁵I]-IGF-1 en concentraciones de entre 3 y 0,5 nM. Se determinó $B_{m\acute{a}x}$ y K_d como estimación del número de receptores y de su afinidad por el radioligando, respectivamente, a través de una curva de regresión no lineal, con el empleo del programa Ligand.

Reactivos

Medio Ham's F12 (MEM F12), mezcla antibiótica-antimicótica; solución salina balanceada de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfatos (PBS) elastasa, insulina e IGF-1 (Sigma Chemical Co.); colagenasa (Clase II) (Worthington Biochem. Corp.);

suero fetal bovino (Gen S.A., Argentina); anticuerpo anti-alfa-actina (Boehringer Mannheim Biochem.); fructosa (Parafarm, Argentina); kits para determinación de glucemia (Wiener Lab. Argentina); [¹²⁵I]-yoduro de sodio y [³H]-timidina (New England Nuclear).

Análisis de datos

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. La comparación entre los grupos se realizó por análisis de la varianza de dos vías y *postest* de Bonferroni (con estimación de la significación limitado a niveles 0,05 y 0,01). Se consideraron significativas las diferencias con $p < 0,05$.

RESULTADOS

La Figura 1 presenta los resultados de la prueba de tolerancia a la sobrecarga intraperitoneal de glucosa observados en el grupo de animales que recibieron fructosa en forma crónica y sus controles. Se observa que los animales tratados desarrollaron intolerancia a la glucosa, lo cual se comprueba por el aumento significativo del área bajo la curva de valores de glucemia en respuesta a la sobrecarga de glucosa: 1.443 ± 87 versus 1.119 ± 38 mmol/L 120 minutos ($p < 0,01$).

La Figura 2 muestra la evolución de los niveles de presión arterial sistólica en los animales tratados con fructosa y sus controles. Se evidenció un aumento en el grupo FFR a partir de la segunda semana de tratamiento ($p < 0,001$), que se mantuvo hasta el final del período experimental. Si bien los niveles alcanzados no corresponden a una hipertensión severa, se aprecia una diferencia altamente significativa con respecto a los niveles tensionales del grupo control.

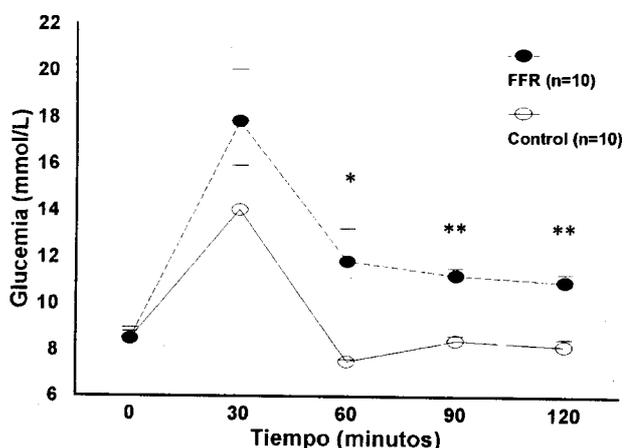


Fig. 1. Valores de glucemia (media + sem) obtenidos inmediatamente antes y luego de una sobrecarga de glucosa. Los círculos llenos corresponden al grupo FFR y los círculos vacíos al grupo control. Los símbolos indican: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

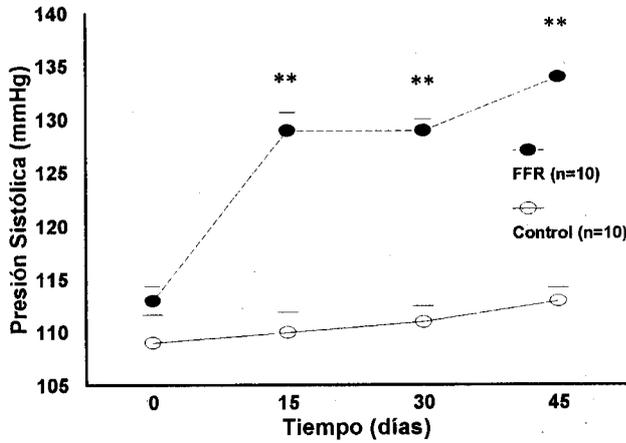


Fig. 2. Evolución de los niveles de presión arterial sistólica (media + sem) desde el inicio hasta el final del período experimental. Los círculos llenos corresponden al grupo FFR y los círculos vacíos al grupo control. Los símbolos indican: ** $p < 0,001$.

El desarrollo del modelo patológico se asoció con aparición de hipertrofia cardíaca. Los valores obtenidos para el índice que relaciona el peso cardíaco con el peso corporal total en el grupo FFR fue significativamente mayor ($p < 0,001$) que en el grupo control: $260 \pm 1,1$ versus $248,5 \pm 1,3$ mg corazón/100 g peso corporal, respectivamente.

La síntesis de DNA frente al estímulo de SFB 10%, estimada a través de la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina, fue significativamente mayor en las cMLV de aorta y lecho vascular mesentérico provenientes de los animales del grupo tratado con fructosa. La Figura 3 presenta esos resultados expresados a tra-

vés de la actividad del radioisótopo incorporado en cada fosa (cpm/fosa). En la Figura 4, las cuentas radiactivas incorporadas en cada grupo de cMLV por efecto del SFB 10% se expresan como variación porcentual con respecto a la actividad de su propio control (SFB 0,1%).

Se diseñaron dos tipos de experimentos con el objeto de comprobar si la insulina tiene algún papel en el desarrollo de la respuesta proliferativa aumentada de las cMLV aórticas y mesentéricas provenientes de los animales que recibieron fructosa. En el primer caso, las cMLV quiescentes fueron incubadas sólo con SFB al 0,1% (control) o en presencia de dos concentraciones de insulina (100 y 500 $\mu\text{U}/\text{ml}$) durante 24 horas y se evaluó la respuesta proliferativa a través de la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina. La Figura 5 muestra que la insulina, en concentraciones ligeramente superiores a los niveles observados en estados de hiperinsulinemia, no fue capaz de provocar diferencias significativas en la respuesta proliferativa de los grupos de cMLV estudiados.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la insulina ejerce su acción como factor de crecimiento celular a través de su unión a receptores para IGF-1, (14) se realizó el estudio de unión a receptores mediante el análisis de experimentos de saturación, en el que se utilizó como radioligando $[^{125}\text{I}]$ -IGF-1. Las determinaciones de K_d mostraron valores de $1,990 \pm 0,4230$ nM (C) versus $1,759 \pm 0,2961$ nM (FFR) (NS) que sugieren que no hubo cambios significativos en su afinidad por el radioligando, mientras que los valores de $B_{\text{máx}}$: $11,53 \pm 1,407$ pM versus FFR: $7,265 \pm 0,6509$ pM indican una disminución significativa ($p = 0,020$)

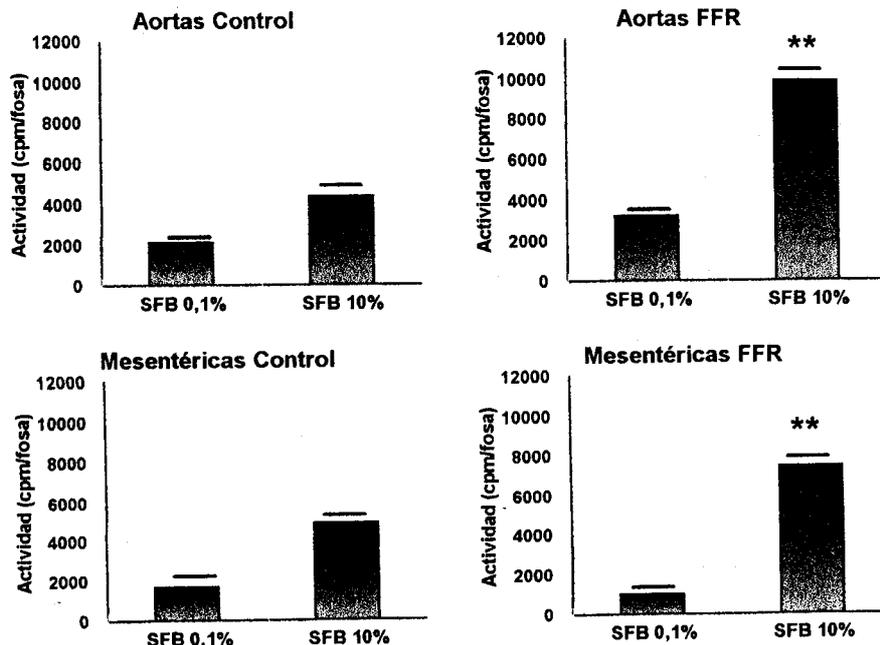


Fig. 3. Proliferación de cMLV en presencia de SFB 10% y SFB 0,1%, medida a través de la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina para sintetizar DNA. Las barras indican media + sem de la actividad medida en 6 fosas, cada una contada por triplicado. El panel superior izquierdo muestra la respuesta de cMLV aórticas del grupo control; el panel superior derecho las cMLV aórticas de FFR; el panel inferior izquierdo las cMLV mesentéricas control y el panel inferior derecho las cMLV mesentéricas FFR. Los símbolos ** indican $p < 0,01$ versus cMLV del grupo control con SFB 10%.

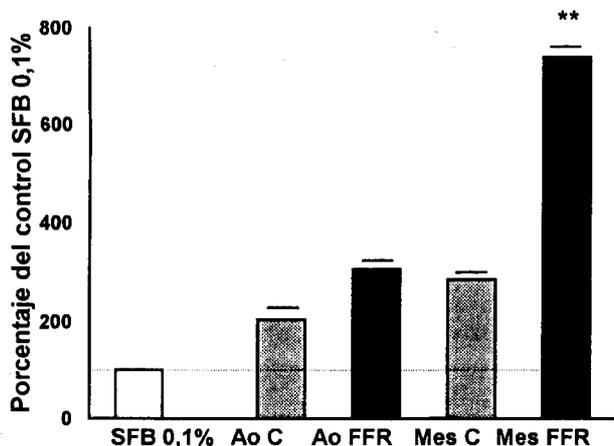


Fig. 4. Proliferación de cMLV estimuladas con SFB 10%, a través de la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina para sintetizar DNA, expresado como variación porcentual respecto de su propio control (SFB 0,1%). Las barras indican media + sem de la actividad medida en 6 fosas, cada una contada por triplicado. Los símbolos indican: *p < 0,05 y **p < 0,01 versus cMLV del grupo control.

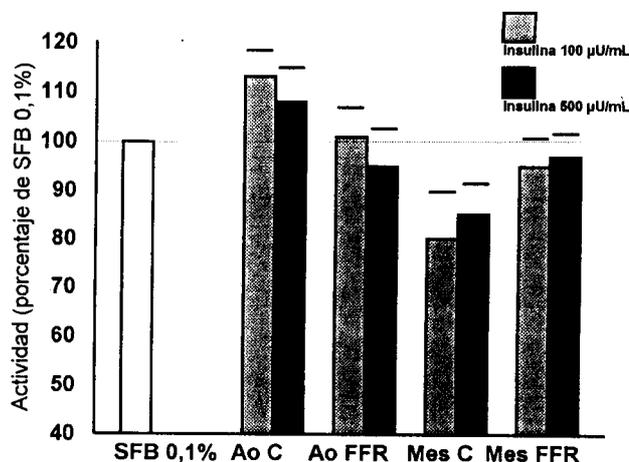


Fig. 5. Efecto de dos concentraciones de insulina (100 y 500 µU/ml) sobre la respuesta proliferativa de cMLV en cultivo, expresadas en porcentaje respecto de la incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina frente a SFB 0,1%. Las barras indican media + sem de la actividad medida en 6 fosas, cada una contada por triplicado. Las diferencias observadas no son significativas.

en el número de receptores. La Figura 6 muestra las curvas de regresión no lineal que describen el análisis de saturación.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran que los procedimientos realizados condujeron a la obtención efectiva de un modelo experimental de alteración en el metabolismo glucídico, comprobable por el aumento altamente significativo del área bajo la curva

de la prueba de tolerancia a la glucosa. Por otra parte, la alteración metabólica se asoció con un aumento significativo de la presión arterial sistólica.

Los mecanismos involucrados en la intolerancia a la glucosa inducida por la administración crónica de fructosa incluyen insulinorresistencia, disminución en la lipogénesis estimulada por insulina y en la oxidación de glucosa, debida probablemente a un defecto en la actividad del receptor de insulina y cambios en la cascada de eventos intracelulares posreceptor de insulina. (8, 15, 16)

Las alteraciones metabólicas observadas en diabéticos, y también en este modelo experimental, pueden inducir cambios en las células del músculo liso pertenecientes a la microvasculatura y la macrovasculatura. En primer lugar, la hiperglucemia se consideró como uno de los mayores factores asociados con complicaciones vasculares, como lo ha demostrado el *Diabetes Complications and Control Trial*. (17) Entre los múltiples mecanismos propuestos para explicar el efecto adverso de la hiperglucemia sobre las cMLV se destacan la glicación no enzimática, la activación de la vía metabólica de la aldosa-reductasa con cambios en la concentración de sorbitol-mioinositol, la alteración en el potencial redox por modificación de la relación entre NADH/NAD a causa del estrés oxidativo en estas células y el aumento de los niveles de diacilglicerol (DAG) que pueden activar la proteinquinasa C, lo cual podría afectar la permeabilidad y la contractilidad vascular, el crecimiento celular, la expresión de moléculas de adhesión y la regulación de los procesos de coagulación y fibrinólisis. (18)

Además de la hiperglucemia, se puso especial

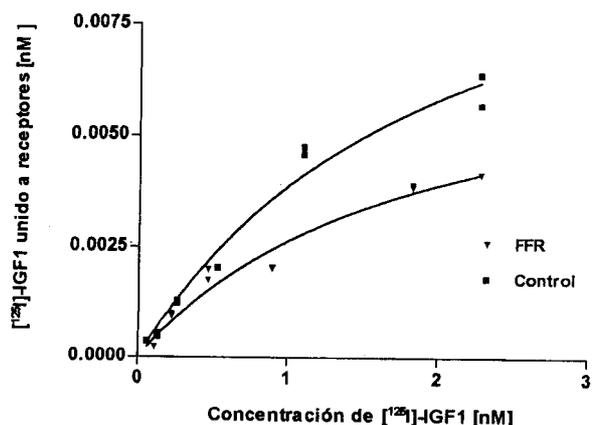


Fig. 6. Resultado de ensayos de saturación, graficando la concentración de $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-1}$ unido a receptores en función de la concentración del radioligando. Los cuadros indican valores correspondientes al grupo control, en tanto que los triángulos indican los correspondientes al grupo FFR. Para cada punto representa cuentas triplicadas de 4 fosas. Se observa menor unión máxima en las cMLV aórticas provenientes del grupo FFR, indicativa de menor número de receptores en estas células.

interés en el papel de factores de crecimiento en el desarrollo de las alteraciones vasculares asociadas con diabetes, en especial insulina y factores de crecimiento similares a insulina (IGF). (19) Se sugirió que la presencia de resistencia a la insulina conduciría a hiperinsulinemia, lo cual podría estimular la proliferación de cMLV y agravaría el proceso aterosclerótico. Sin embargo, se discute si las concentraciones de insulina necesarias para ejercer un efecto proliferativo deberían superar los niveles fisiológicos y aun fisiopatológicos de la hormona. (20) En nuestro modelo, las células de la pared vascular fueron sometidas *in vivo* a una situación de resistencia a la insulina por un tiempo relativamente prolongado. En los primeros pasajes del cultivo observamos que la respuesta proliferativa frente a SFB 10% fue significativamente mayor en los animales tratados. Sin embargo, su respuesta frente a la incubación durante 24 horas con insulina, en concentraciones ligeramente superiores a niveles fisiopatológicos, no fue significativamente diferente de los controles. Esto sugiere que la insulina *per se* no sería el factor responsable principal del aumento de proliferación frente a SFB 10%. El estado de resistencia a la acción de la insulina modificaría también su acción como mediador o modulador del efecto de otras hormonas vasoactivas, como endotelina, angiotensina o factor de necrosis tumoral, que podrían así promover el crecimiento celular sin modulación de su efecto. (18)

Por otra parte, las cMLV presentan una expresión de receptores para insulina baja o ausente, en tanto que muestran una expresión del receptor para IGF-1 elevada (21) y son sensibles a algunos efectos metabólicos de estas sustancias, (22) como transporte de glucosa mediante GLUT-4 y activación de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa. Nuestros datos indican la presencia de cambios en la cinética de unión ligando-receptor para IGF-1. Observamos que la constante de disociación (K_d), que estima la afinidad del receptor por el ligando, no presenta cambios significativos, en tanto que la unión máxima ($B_{máx}$), que estima el número de receptores en el sistema en estudio, presentó niveles significativamente disminuidos en las cMLV provenientes de los animales tratados. Este hecho constituye una explicación adicional para la resistencia a los efectos de la insulina en estas células. Estudios previos (23) señalan que el tratamiento prolongado con insulina sobre cMLV en cultivo reduce el número de receptores para IGF-1. Este resultado apoyaría nuestra observación, dado que en el modelo utilizado en este trabajo los animales fueron sometidos a la sobrecarga de fructosa durante un tiempo relativamente prolongado.

La hipertrofia cardíaca observada en los animales tratados con fructosa confirma resultados ante-

riores. (24) Se propuso que la hipertrofia observada en este caso no se debería únicamente al incremento en la presión arterial, sino también al efecto de la angiotensina II, cuya concentración plasmática se describió aumentada en este modelo. Estudios anteriores lograron disminuir los niveles de hipertrofia ventricular derecha mediante tratamiento con losartan. (24) Esos estudios señalan que tratamientos con losartan o con ramipril (6) lograron disminuir la presión sistólica a niveles semejantes a los animales controles y mejorar la tolerancia a la sobrecarga de glucosa, habiéndosele atribuido al bloqueo de la síntesis de angiotensina o su unión al receptor AT1, así como al aumento de síntesis y prolongación de la vida media de las quininas, un papel destacado en el control terapéutico de esas alteraciones.

En resumen, la sobrecarga crónica de fructosa en la dieta fue capaz de inducir resistencia a la acción de la insulina, aumentar significativamente los valores tensionales y provocar hipertrofia cardíaca. Las células de músculo liso vascular provenientes de dos vasos funcionalmente diferentes de estos animales mostraron mayor respuesta proliferativa en pasajes iniciales, al tiempo que no modificaron su capacidad de síntesis de DNA por efecto de insulina y disminuyeron el número de receptores para IGF-1. Estos datos podrían contribuir al esclarecimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo de las lesiones vasculares asociadas con el síndrome X.

SUMMARY

VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION IN RATS WITH GLUCOSE INTOLERANCE

Introduction

The X syndrome is characterized by insulin resistance and hypertension. The aim of this study was to evaluate cultured vascular smooth muscle cells (VSMc) proliferation, obtained from a distribution artery (aorta) and a resistance vessel (mesenteric bed) of rats with an insulin resistance experimental model (FFR).

Methods

Thirty days Wistar rats were divided into two groups: control (C; n = 10) and FFR (n = 10). FFR received fructose 10% w/v in their drinking water during 45 days. After this period, glucose tolerance test (GTT), systolic blood pressure (SBP) and relative heart weight (RHW) were evaluated. The proliferative effect of 10% fetal calf serum (10% FCS) and insulin (100 and 500 μ U/ml) was studied in cultured VSMc, passage 2, obtained from thoracic aorta and mesenteric vascular bed, by [3 H]-thymi-

dine incorporation A saturation analysis for IGF-1 receptors with the radioligand [¹²⁵I]IGF-1 was also performed.

Results

FFR showed a greater area under the curve in the GTT: 1.443 ± 87 versus 1.119 ± 38 mmol/L 120 minutes ($p < 0.01$), SBP: 134 ± 1.3 versus 113 ± 1.3 mm Hg ($p < 0.001$) and RHW: 260 ± 1.1 versus 248.5 ± 1.3 mg heart/100 g body weight ($p < 0.001$). [³H]-thymidine incorporation was enhanced in aortic VSMC of FFR: $307.2 \pm 14.7\%$ ($n = 6$) versus C: $205.5 \pm 23.6\%$ ($n = 6$) ($p < 0.05$), and in mesenteric VSMC of FFR: 739.4 ± 22.3 ($n = 6$) versus C: $286.2 \pm 16.7\%$ ($n = 6$) ($p < 0.001$). There was no difference in the proliferative effect of insulin. Primary cultures of FFR aortic VSMC showed a significant reduction in IGF-1 receptor number ($p < 0.05$) without change in the affinity.

Conclusions

FFR developed glucose intolerance and hypertension with heart hypertrophy. FFR cultured VSMC showed a greater proliferative response to an inespecific factor as 10% FCS, but no to insulin, presenting also a smaller IGF-1 receptor number. These findings could contribute to the explanation of the mechanisms involved in the cardiovascular changes associated to insulin resistance.

Key words Insulin resistance - Hypertension - Vascular smooth muscle - Insulin

BIBLIOGRAFIA

- Ferranini E, Haffner SM, Stern MP. Essential hypertension: an insulin-resistant state. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl 5): S18-S25.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
- Ferro CJ, Webb DJ. Endothelial dysfunction and hypertension. *Drugs* 1997; 53 (Suppl 1): 30-41.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
- Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987; 10: 512-516.
- Miatello RM, Damiani MT, Nolly HL. Cardiovascular kinin-generating capability in hypertensive fructose-fed rats. *J Hypertens* 1998; 16: 1273-1277.
- Tuovinen CGR, Bender AE. Some metabolic effects of prolonged feeding of starch, sucrose, fructose and carbohydrate-free diet in the rat. *Nutr Metab* 1975; 19: 161-172.
- Bar-On H, Stein Y. Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. *J Nutr* 1968; 94: 94-105.
- Cruzado M, Risler N, Castro C, Ortiz A, Rüttler M. Proliferative effect of insulin on cultured smooth muscle cells from rat mesenteric resistance vessels. *Am J Hypert* 1998; 11: 54-58.
- Pang SC, Venance SL. Cultured smooth muscle approach in the study of hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; 70: 573-579.
- Chamley-Campbell JH, Campbell JR. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol* 1981; 89: 379-383.
- Pang SC. Proliferation of aortic smooth muscle cells of genetically hypertensive and normotensive rats in culture. *J Pathol* 1989; 158: 167-173.
- Griffiths B. Scaling-up of animal cell cultures. *En: Freshney RI (ed). Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford, IRL Press 1992; 47-63.
- King GL, Goodman AD, Buzney S y col. Receptors and growth promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J Clin Invest* 1985; 75: 1028-1036.
- Luo J, Rizkalla SW, Lerer-Metzger M y col. A fructose-rich diet decreases insulin-stimulated glucose incorporation into lipids but not glucose transport in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr* 1995; 125: 164-171.
- Liu L, Steverson DL. Myocardial lipoprotein lipase activity: regulation by diabetes and fructose-induced hypertriglyceridemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 369-377.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
- Hein KD, King GL. Vascular abnormalities in diabetes mellitus. *En: Sowers JR, Totowa NJ (eds). Contemporary Endocrinology: Endocrinology of the Vasculature*. Humana Press Inc 1996; 135-144.
- Bakris GL, Standley PR, Palant CE, Walsh MF, Sowers JR. Analogy between endothelial/mesangial cells and endothelial/vascular smooth muscle cells interactions: role of growth factors and mechanotransduction. *En: Sowers JR, Totowa NJ (eds). Contemporary Endocrinology: Endocrinology of the Vasculature*. Humana Press Inc 1996; 341-356.
- Grant M, King GL. IGF-1 and blood vessels: implications for microvascular and macrovascular disease. *Diabetes Rev* 1995; 3: 113-128.
- Amqvist HJ, Bomfeldt KE, Chen Y, Lindstrom T. The insulin-like growth factor system in vascular smooth muscle: interaction with insulin and growth factors. *Metabolism* 1995; 44 (10, Suppl 4): 58-66.
- Sowers JR, Epstein M. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease and nephropathy: an update. *Hypertension* 1995; 26: 869-879.
- Ko Y, Nettekoven W, Christian R y col. Long-term insulin treatment of vascular smooth muscle cells from rat aorta attenuates the synergistic effect of insulin on angiotensin II- and epidermal growth factor-induced DNA synthesis. *Clin Sci (Colch)* 1993; 84: 435-440.
- Iyer SN, Katovich MJ. Effect of acute and chronic losartan treatment on glucose tolerance and insulin sensitivity in fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 1996; 9: 662-668.