

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia

**MECANISMOS IMPLICADOS EN LOS CAMBIOS
ESTRUCTURALES, MECÁNICOS Y FUNCIONALES
ASOCIADOS A PROCESOS INFLAMATORIOS DE
ARTERIAS CEREBRALES Y MESENTÉRICAS DE
RESISTENCIA DE RATA**

Tesis presentada por Francesc Jiménez Altayó para optar al grado
de Doctor en Biología por la Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

ELISABET VILA CALSINA, Catedrática del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y **ANA MARÍA BRIONES ALONSO**, Investigadora Contratada de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación denominado *Mecanismos implicados en los cambios estructurales, mecánicos y funcionales asociados a procesos inflamatorios de arterias cerebrales y mesentéricas de resistencia de rata*, elaborado por Francesc Jiménez Altayó para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección en el Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y reúne los requisitos necesarios para su defensa.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Bellaterra a 4 de Mayo de 2006

Elisabet Vila Calsina

Ana M Briones Alonso

Es de noche, estoy solo, sentado en un sofá. Fuera cae la noche sureña. Estoy tranquilo, bastante relajado. Pienso en estos últimos años...como pasa el tiempo...

Todo empezó un verano, la Doctora Vila me recibió en su despacho en una calurosa tarde de principios de septiembre. Siempre le agradeceré esa primera oportunidad, fue mi mentora desde el principio (moltes gràcies Elisabet). Poco después conocí a José y a David, entrañables personas, capaces de resolverse cualquier problema, pero sobre todo, grandes amigos. Serguei dio el toque exótico a mi primera etapa en el departamento, extravagante e interesante persona con la que compartí grandes carcajadas. La profesora Victoria Clos siempre dispuesta a compartir interesantes conversaciones en los telediarios del mediodía, sin duda es el claro ejemplo de que vivir pasándotelo bien es lo más importante. El mítico Doctor Badia, cuya personalidad sobrepasa lo científico y con el que me siento muy orgulloso de compartir el mismo "ídolo". El Doctor Baños, que en las comidas del departamento me demostró que no es tan serio como parece. Mis compañeros de esa época, Guido, Susana, María del Mar, siempre me animaron y siempre los recordaré.

Algunos meses después conocí a Ana, gran científica y mejor persona, me siento orgulloso de ser su "primer becario". Gran parte de esta tesis se la debo a ella.

Nunca había conocido a un técnico de laboratorio, me habían comentado que eran seres extraños que habitaban en los bosques...después de conocer a Noelia pensé que debían ser personas cojonudas. Y de Jero, que puedo decir de él, una persona interesantísima y con la que no paro de reir nunca.

Maite, es más fácil empezar cada mañana si estás tú por ahí cerca.

Me he enriquecido conociendo a personas de otros grupos, la Doctora Planas, el Doctor Giraldo, Abraham, Santi, Xavi, Carles, Fernando,...muchas gracias a todos.

Con los actuales compañeros del departamento hemos conseguido formar un grupo extraordinariamente compenetrado. Sonia, persona sensible y trabajadora, hemos compartido tantas horas juntos que ya es casi mi segunda hermana. Marta, quien me ha demostrado la fuerza interior que puede tener una persona para superar los malos momentos, eres impresionante. Miriam, el genio personificado, una persona capaz de sacrificar lo suyo para ayudarte y con eso lo digo todo. Y en la última etapa, Laura, simpatiquísima y siempre dispuesta a echarte una mano. A los compañeros del departamento de Fisiología, muy especialmente a Toni y a Laura, con los que he compartido más de una sonrisa y cafés. Gracias por tu ayuda, *Songo* ;)

Y como no mencionar a los amigos de la carrera Philippe, Rosa, Sergio, Elena, Marc, Susana y a muchos otros, que durante este período me han aportado inolvidables momentos personales.

A mi familia se lo debo todo, especialmente a mis padres y a mi hermana, que han confiado en mí desde el principio, me han apoyado y han hecho cosas por mí que siempre valoraré. A mis abuelos. A mi tío Domingo, por ser un ejemplo y por esa frase “quien la sigue la consigue”. A mi familia política por soportar tanto ordenador y tanto artículo.

Muy especialmente a tí Teresa, que te uniste a mi camino para luchar y que por ello y por mucho más, lo eres todo.

*Amb el suport del Departament d'Universitats,
Recerca i Societat de la Informació i del
Fons Social Europeu; Generalitat de Catalunya.*

ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN	19
1. Estructura arterial	21
1.1 Túnicas arteriales	22
1.1.1 Túnica íntima	22
1.1.2 Túnica media	23
1.1.3 Túnica adventicia	25
1.2 Matriz extracelular	26
1.2.1 Colágeno	27
1.2.2 Elastina	29
1.2.3 Glicoproteínas, proteoglicanos e integrinas	33
2. Clasificación de las arterias	35
2.1 Arterias elásticas	35
2.2 Arterias musculares de conductancia	36
2.3 Arterias musculares de resistencia	36
2.4 Vasos de intercambio	37
2.5 Vasos de capacitancia	38
3. Mecanismos que controlan el tono vascular	40
3.1 Óxido nítrico	40
3.2 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio	42
3.3 Especies reactivas de oxígeno	44
3.4 Prostaciclina y otros eicosanoides	47
3.5 Otros mediadores	48
4. Patologías vasculares	50
4.1 Endotoxemia	51
4.2 Isquemia cerebral	53
5. Papel de las citoquinas en las alteraciones vasculares	55
6. Remodelado vascular	59

6.1 Remodelado vascular y citoquinas	61
6.2 Remodelado vascular y tono miogénico en isquemia cerebral	62
OBJETIVOS	65
MATERIAL Y MÉTODOS	69
1. Animales de experimentación	71
2. Modelo de isquemia cerebral focal	71
3. Preparación del tejido	74
4. Evaluación del volumen de infarto	75
5. Cultivo tisular	77
6. Miografía de perfusión	80
6.1 Características generales	80
6.2 Estudios estructurales, mecánicos y de tono miogénico	81
6.2.1 Parámetros estructurales	83
6.2.2 Parámetros mecánicos	84
6.2.3 Parámetros miogénicos	86
6.2.4 Estudios de reactividad	87
7. Determinación de la expresión enzimática	88
7.1 Western Blot	88
7.2 Inmunofluorescencia	90
8. Determinación de la producción de anión superóxido	91
9. Determinación de la producción de nitritos	92
10. Microscopía confocal de fluorescencia	93
10.1 Estudio de la estructura general y de la distribución celular de la arteria cerebral media	96
10.2 Estudio de la distribución de la elastina de la lámina elástica interna	97

11. Determinación de colágeno y de elastina mediante rojo sirio y Verhoff Van Gieson.	99
11.1 Tinción de colágeno	100
11.2 Tinción de elastina	100
12. Soluciones	101
12.1 Fisiológicas	101
12.2 Western Blot	101
12.3 Determinación de nitritos	102
12.4 Paraformaldehído	102
13. Fármacos y reactivos	103
14. Expresión de los datos y análisis estadístico	104
Capítulo I. Efecto de la isquemia cerebral sobre las propiedades estructurales, mecánicas y miogénicas de las arterias cerebrales medias	107
Resultados	109
1. Análisis del volumen de infarto	109
2. Efecto de la isquemia cerebral sobre la geometría de las arterias cerebrales	110
3. Efecto de la isquemia cerebral sobre la mecánica de las arterias cerebrales	113
4. Efecto de la isquemia cerebral sobre el tono miogénico de las arterias cerebrales	115
5. Efecto de la isquemia cerebral sobre la estructura y la distribución celular de las arterias cerebrales	117

6. Efecto de la isquemia cerebral sobre la cantidad de colágeno y la organización de elastina	122
7. Efecto de la isquemia cerebral sobre la producción de anión superóxido	127
Discusión	129
Capítulo II. Efecto de la IL-1β sobre las propiedades estructurales, mecánicas y funcionales de las arterias mesentéricas de resistencia	141
Resultados	143
1. Efecto de la IL-1 β sobre la geometría de las arterias mesentéricas de resistencia	143
2. Efecto de la IL-1 β sobre la mecánica de las arterias mesentéricas de resistencia	146
3. Efecto de la IL-1 β sobre la función de las arterias mesentéricas de resistencia	147
3.1 Efecto de la IL-1 β sobre las relajaciones dependientes e independientes de endotelio	147
3.2 Efecto de la IL-1 β sobre la expresión de eNOS y de GCs	151
3.3 Efecto de la IL-1 β sobre la producción de nitritos y sobre la expresión de iNOS	153
3.3.1 Papel de iNOS en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β	155

3.4 Efecto de la IL-1 β sobre la producción de anión superóxido y sobre la expresión de xantina oxidasa y de p22 ^{phox}	156
3.4.1 Papel de los aniones superóxido en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β	163
3.4.2 Papel de la xantina oxidasa en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β	166
3.4.3 Papel de la NADPH oxidasa en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β	167
Discusión	169
CONCLUSIONES	181
BIBLIOGRAFÍA	185

ABREVIATURAS

1400W: N-3-aminometilbencilacetamida
8-BrGMPc: 8-bromoguanosina 3',5'-monofosfato cíclico
AI: angiotensina I
AI: angiotensina II
ACh: acetilcolina
ACM: arteria cerebral media
Alopurinol: 4-hidroxipirazolo[3,4-d]pirimidina
AMR: arteria mesentérica de resistencia
ANOVA: análisis de la varianza
Apocinina: 4-hidroxi-3-metoxiacetofenón
APS: persulfato amónico
ASL: área de la superficie luminal
AST: área de la sección transversal
AT₁: receptores de angiotensina 1
AT₂: receptores de angiotensina 2
ATP: adenosina trifosfato
CML: célula muscular lisa
COX: ciclooxigenasa
EDHF: factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EGTA: etilén glicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-ácido tetraacético
eNOS: sintasa del óxido nítrico endotelial
ET: endotelina
FE: fenilefrina
GCs: guanilato ciclasa soluble
GMPc: guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico
GTP: guanosina trifosfato
HE: hidroetidina
HEPES: ácido 4-(2-Hidroxietil)-piperacín-1-etano-sulfónico
OH: radical hidroxilo
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
Hoechst: 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperacínil)-2, 5'-bi-1H-benzimidazol
IL: interleuquina
iNOS: sintasa del óxido nítrico inducible
KH: solución de Krebs-Henseleit
LEE: lámina elástica externa
LEI: lámina elástica interna
L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil éster
MEC: matriz extracelular
MMP: metaloproteínasa

NADPH: nicotina adenina dinucleótido reducido
nNOS: sintasa del óxido nítrico neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: sintasa del óxido nítrico
NPS: nitroprusiato sódico
O₂⁻: anión superóxido
ONOO⁻: peroxinitrito
PBS: tampón fosfato
PEG-SOD: polietilenglicol-superóxido dismutasa
Pen-Estrep: penicilina-estreptomicina
PFA: paraformaldehído
PG: prostaglandina
PGI₂: prostaciclina
ROC: canales operados por receptor
SD: Sprague-Dawley
SDS: lauril sulfato sódico
SOD: superóxido dismutasa
TGF-β₁: factor de crecimiento tumoral - β
TNF-α: factor de necrosis tumoral - α
TTC: cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio
TX: tromboxano
WKY: Wistar Kyoto
XO: xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

La presión arterial se mantiene dentro de límites fisiológicos mediante ajustes del gasto cardíaco y de las resistencias periféricas, que a su vez están controlados tanto por factores neurohumorales (sistema nervioso central y periférico, sistema renina-angiotensina aldosterona, factores vasoactivos liberados por el endotelio) como por factores físicos como el volumen de sangre arterial y la distensibilidad de los vasos. El gasto cardíaco es el volumen de sangre que bombea el corazón por minuto y viene determinado por la frecuencia cardíaca y por el volumen sistólico (volumen de sangre expulsado por el corazón en cada latido). La resistencia periférica vascular, que se define como la resistencia que oponen los vasos a que la sangre fluya a través de ellos, viene dada principalmente por la parte distal de la vasculatura que consiste en las arterias pequeñas de resistencia y en las arteriolas (Christensen y Mulvany, 2001).

1. ESTRUCTURA ARTERIAL

La estructura general de la pared arterial es muy similar en todos los tipos arteriales. Sin embargo, según el territorio vascular analizado, la proporción de algunos de sus elementos (lámina elástica y células musculares lisas; CMLs) varía. Las arterias se componen fundamentalmente de 3 capas concéntricas: una interna o íntima, una central o media y una

capa más externa denominada adventicia (Figura 1). Cada capa de células se encuentra embebida en la matriz extracelular (MEC) que sirve de soporte y de comunicación entre las células.

1.1 Túnicas arteriales

1.1.1 Túnica íntima

La túnica íntima es la capa interna del vaso que se encuentra en contacto directo con la sangre circulante. Está formada por el endotelio y el subendotelio o lámina basal que limita con la lámina elástica interna (LEI). El endotelio es una monocapa de células cuyo espesor es de 0.2-0.4 μm , su ancho de 10 μm y su longitud aproximada de 100 μm . Esta monocapa de células endoteliales descansa sobre la membrana basal rica en colágeno, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Sumpio y cols., 2002). A su vez, la membrana basal descansa sobre una LEI muy fina y fenestrada (Lee, 1995; Briones y cols., 2003), que separa la túnica íntima de la túnica media. Las células endoteliales están unidas entre sí mediante uniones ocluyentes, uniones tipo nexo y uniones estrechas (Dejana y cols., 1995; Telo y cols., 1997; Schnittler, 1998; Michiels, 2003). La tasa de renovación de las células endoteliales en condiciones normales es muy baja (de dos a tres años), salvo en los puntos de ramificación donde la actividad mitótica es algo mayor. La capa endotelial regula el intercambio de sustancias con los tejidos

subyacentes y además, como se menciona más adelante, en ella se lleva a cabo una intensa actividad metabólica que ejerce una influencia significativa sobre el tono vascular.

1.1.2 Túnica media

La túnica media es la de mayor grosor. Está formada por CMLs fusiformes dispuestas circular o helicoidalmente en 2-3 capas, hasta 40 en las arterias más grandes, alrededor del lumen del vaso. Estas células, cuyo diámetro es de 2-5 μm y su longitud de 20-60 μm , tienen un único núcleo central y se encuentran embebidas en una MEC rica en elastina y colágeno (Figura 1).

La túnica media, además de servir como soporte muscular de la pared arterial, es la encargada de la actividad vasomotora. El aparato contráctil se encuentra en el interior de las CMLs y está formado por filamentos finos de actina y gruesos de miosina. Una característica destacable de las CMLs es la presencia de uniones tipo nexo que son uniones entre células vecinas que aseguran una unidad funcional y que facilitan la coordinación de la contracción (Lagaud y cols., 2002). Asimismo, las CMLs mantienen contacto con las células endoteliales a través de las fenestras de la LEI (Rhodin, 1980). La proporción de tejido conectivo y de CMLs varía según el diámetro del vaso y su función.

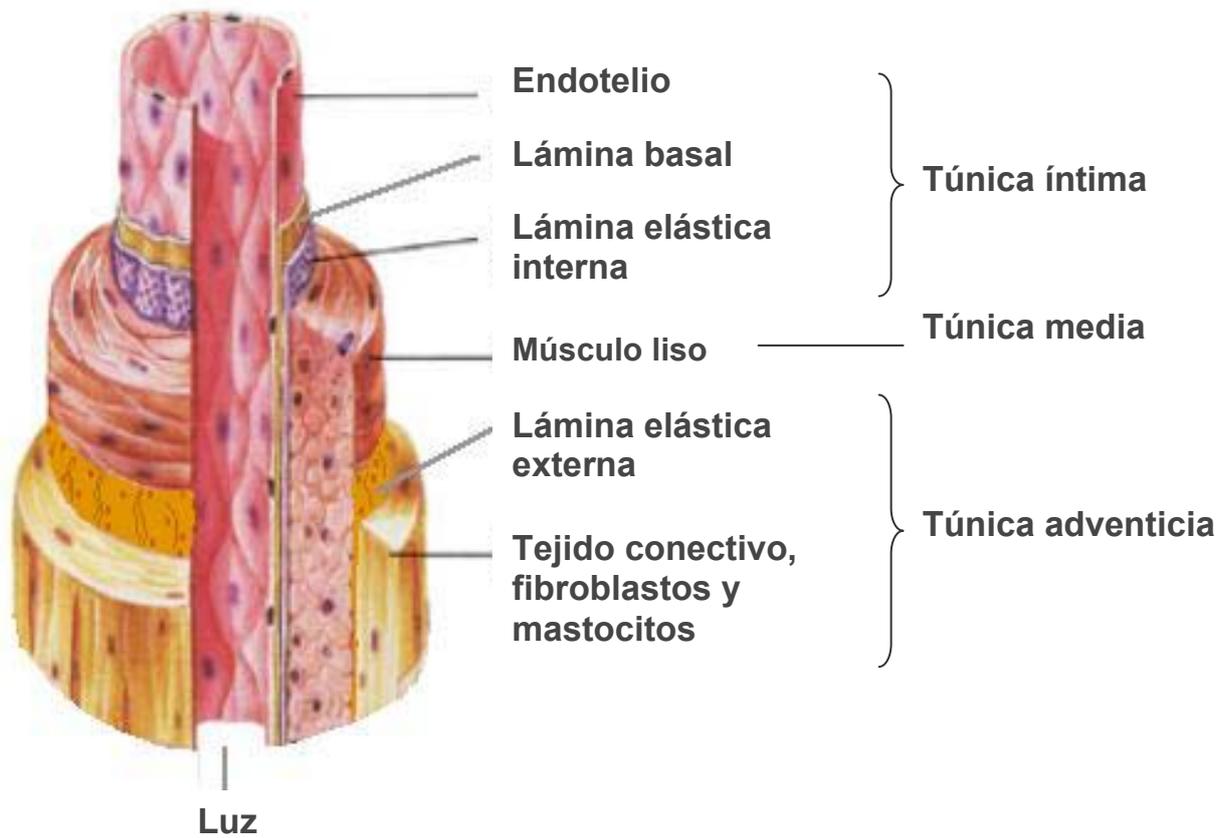


Figura 1. Diagrama representativo de la estructura arterial (modificado de Fox, 1993).

1.1.3 Túnica adventicia

La túnica adventicia es la capa más alejada de la luz del vaso. Está formada por tejido conectivo (colágeno y elastina), fibroblastos de orientación longitudinal y mastocitos. Una membrana, denominada lámina elástica externa (LEE), separa esta capa de la túnica media (Figura 1). A través de la túnica adventicia penetran una red de vasos de calibre muy pequeño denominados *vasa vasorum* y las fibras nerviosas que inervan las arterias (Hirst y Edwards, 1989). Los *vasa vasorum* ocasionalmente penetran en la túnica media y su función parece estar relacionada con el metabolismo de la pared (Stefanadis y cols., 1995).

Tradicionalmente se ha considerado que la función principal de la túnica adventicia es ejercer de soporte estructural de los vasos sanguíneos. No obstante, recientemente se ha sugerido que podría jugar un papel importante en la patogenia de algunas enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis (Gutterman, 1999) y la hipertensión (Arribas y cols., 1997a; b; Kantachuvesiri y cols., 2001).

A pesar de que esta disposición en tres capas es común a todos los vasos sanguíneos, existen diferencias en relación a la función de cada región del árbol circulatorio y de cada sistema (venas, arterias y vasos linfáticos), pudiendo variar, entre otros parámetros, el grosor de cada capa o el grado de inervación de los tejidos (Hirst y Edwards, 1989).

1.2 Matriz extracelular

La MEC, además de su función estructural como soporte de las células de la pared del vaso, está implicada en la mecánica y en la función vascular. La MEC confiere las propiedades de elasticidad y de resistencia al estiramiento y participa en la hidratación, filtración de iones, interacción con células y en la disponibilidad de factores de crecimiento. Las moléculas de la MEC son sintetizadas por los tres tipos celulares: células endoteliales, CMLs y células adventicias. A lo largo de la vida adulta, la pared del vaso está expuesta a múltiples factores que pueden dañar la MEC como deposición de lípidos, hipoxia, secreción de enzimas, producción de radicales libres y elevación de la presión arterial. En respuesta a estos factores, las CMLs pueden sintetizar moléculas de la MEC e inhibidores de las enzimas que la degradan, cambiando su composición y su organización tridimensional. Esta nueva MEC no es tan adecuada funcionalmente como la sintetizada durante la etapa fetal, alterándose la función vascular normal (Jacob y cols., 2001; Figura 2).

Las proteínas más importantes de la MEC son el colágeno y la elastina mientras que los proteoglicanos, las glicoproteínas y las integrinas se encuentran en menor proporción.

1.2.1 Colágeno

El colágeno, del que se han descrito 26 tipos, constituye junto a la elastina, el componente mayoritario de la MEC de la pared vascular. No obstante, a nivel vascular se encuentran predominantemente, los colágenos tipo I y III que representan el 60% y el 30% del total del colágeno vascular respectivamente (Mayne, 1986; Van der Rest y Garrone, 1991; Prockop y Kivirikko, 1995). El 10% restante incluye colágeno de la membrana basal tipo IV, colágeno tipo V, colágeno tipo VI microfibrillar y colágenos tipo VIII, XII y XIV (Figura 2).

El colágeno es una proteína muy rígida cuya función es limitar la distensión del vaso producida por la presión (Jacob, 2003). Como ya hemos comentado anteriormente, los tipos I y III son los predominantes a nivel vascular. El colágeno tipo I es el producto de dos genes diferentes, el $\alpha_1(I)$ y el $\alpha_2(I)$, en cambio, el colágeno tipo III es el producto del gen $\alpha_1(III)$; Rekhter, 1999). El precursor del colágeno es el procolágeno. Los procolágenos $\alpha_1(I)$ y $\alpha_2(I)$ están formados por cadenas polipeptídicas sintetizadas por los fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos que posteriormente son procesadas en el retículo endoplasmático (Verrecchia y Mauviel, 2004). La unidad fibrilar básica del colágeno es una triple hélice de 300 nm. Cada una de las cadenas está constituida por secuencias repetidas de los aminoácidos glicina-X-Y, donde generalmente, la X y la Y son prolina e hidroxiprolina,

respectivamente. Tras su secreción al espacio extracelular y eliminados los extremos N y C-terminales, la triple hélice se agrega formando fibrillas solubles en solución salina y que carecen de fuerza tensora. Posteriormente, gracias a la enzima lisil oxidasa, se forman puentes cruzados que producen la oxidación de residuos específicos de lisina o hidroxilisina. Durante la formación de los puentes cruzados intermoleculares, las fibras de colágeno se hacen cada vez más insolubles y rígidas. La síntesis de colágeno puede estar regulada a nivel de la transcripción, de la estabilidad del ARN mensajero y de la biosíntesis y actividad de cada una de las enzimas involucradas en su procesamiento y ensamblaje (Rekhter, 1999).

El contenido de colágeno en los vasos es el resultado de un equilibrio dinámico entre la degradación y la síntesis. Las enzimas que degradan el colágeno son principalmente las metaloproteinasas (MMPs) MMP-1, MMP-8 y MMP-13 de la matriz (Galis y Khatri, 2002; Newby, 2005). Las MMPs, además de degradar a los componentes de la MEC y de activar a otras MMPs, son también responsables de mantener disponibles y activos determinados factores de crecimiento y citoquinas (Rundhaug, 2005). A su vez, algunos factores de crecimiento y citoquinas como el factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β_1), el factor de crecimiento de la insulina, el factor de crecimiento del tejido conectivo, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleuquina-1 (IL-1) pueden afectar la síntesis de MMPs

(Jugdutt, 2003). Las MMPs están reguladas al nivel de la expresión génica y de la secreción de la proteína por la activación de la proenzima inactiva y por inhibidores de las MMPs. Los inhibidores más importantes de las MMPs *in vivo* son la α -2 macroglobulina y la familia de inhibidores específicos de tejido de las MMPs que se compone de 4 miembros relacionados estructuralmente. Estos inhibidores se unen con una alta afinidad al centro catalítico de las MMPs eliminando su capacidad proteolítica (Lagente y cols., 2005).

El crecimiento de colágeno ($0.56\% \text{ día}^{-1}$) comparado con el resto de proteínas ($7.2\% \text{ día}^{-1}$) es lento (Bonnin y cols., 1981) y su tiempo de vida media (de 80 a 120 días), es diez veces más largo que el del resto de proteínas (Weber y cols., 1992). Esta característica implica que el recambio del colágeno de la MEC después de la degradación es muy lento, aumentando su vulnerabilidad frente a condiciones que implican un incremento en su degradación, como ocurre entre otras patologías, en episodios de isquemia (Jugdutt, 2003).

1.2.2 Elastina

La elastina es la proteína más abundante en arterias de gran tamaño (Jacob, 1993; Rosenbloom y cols, 1993; Debelle y Tamburro, 1999), aunque también es detectable en venas (Travers y cols, 1996; Wali y cols., 2003) y en arterias de resistencia (Briones y cols., 2003). La elastina constituye el

90% de las fibras elásticas, que a su vez contienen otras fibras como las fibrilinas y las microfibrillas asociadas a glicoproteínas (Figura 2). Las fibras de elastina forman láminas fenestradas que permiten el contacto celular a través de sus agujeros. Estas lamelas elásticas están diseñadas para que la tensión se distribuya uniformemente a través de la pared arterial (Arribas y cols., 2006).

La tropoelastina es la proteína precursora de la elastina. Se sintetiza principalmente por las CMLs, aunque los fibroblastos y las células endoteliales también poseen una cierta capacidad elastogénica. Su peso molecular se encuentra entre 68 y 74 KDa dependiendo de la isoforma y es muy hidrofóbica, pero soluble en solución salina. Todas las isoformas de la tropoelastina muestran un patrón de organización molecular similar en el que las regiones hidrofóbicas se alternan con regiones hidrofílicas formadas por puentes cruzados ricos en residuos de lisina (Arribas y cols., 2006). La enzima lisil oxidasa produce puentes cruzados entre residuos de lisinas por una desaminación oxidativa de los grupos NH_2 de la lisina. Esta reacción produce la condensación de 4 lisinas generando isodesmosina y desmosina, o de 3 lisinas que da lugar a allisina (Reiser y cols., 1992). Las regiones hidrofóbicas, responsables de la elasticidad de la proteína, están formadas por repeticiones ricas en valina y glicina (Debelle y Tamburro, 1999).

La elastina está compuesta en un 80% - 90% por aminoácidos alifáticos no polares que le confieren una elevada entropía en su estado relajado, ya que debido a sus dominios hidrofóbicos repele las moléculas de agua que quedan desordenadas. Sin embargo, cuando se encuentra en estado distendido algunas de estas moléculas son capaces de alinearse en las zonas no hidrofóbicas de la molécula estirada y generan una molécula con menor entropía. La elastina presenta afinidad por el calcio y diversos lípidos, como ácidos grasos libres, que impiden el cambio del estado relajado al distendido y reducen la elasticidad de la molécula (Robert, 2002).

La única proteína caracterizada hasta el momento que mantiene contacto celular con la elastina es una proteína de 64 KDa denominada *proteína de unión a elastina*. Esta proteína se une a dos proteínas más formando un receptor que mantiene contacto celular con la laminina y el colágeno tipo IV, por lo que es denominado *receptor de elastina-laminina*. Durante el desarrollo embrionario y en las primeras etapas de la vida postnatal, la proteína de unión a elastina tiene la función de proteína acompañante o chaperonina, colaborando en el transporte de la tropoelastina desde el interior hasta el exterior celular. A lo largo de la elastogénesis, esta proteína va quedando anclada en la membrana celular formando, junto a las otras dos proteínas, el receptor trimérico. En adultos, este receptor se encuentra localizado en las CMLs, en los fibroblastos, en las células

endoteliales y en las células fagocíticas (Arribas y cols., 2006). La elastogénesis se inicia muy temprano en el desarrollo embrionario y termina en los primeros meses de vida postnatal. En condiciones normales, la síntesis de las fibras elásticas se produce en un período muy corto durante el que la tropoelastina es producida y procesada continuamente. Se han descubierto un gran número de factores solubles que modulan la síntesis de elastina. Así, TGF- β , IL-1 β , glucocorticoides y ácido retinóico favorecen la síntesis mientras que TNF- α , interferon- γ y vitamina D₃ disminuyen la expresión de elastina.

La elastina, cuando está polimerizada es prácticamente insoluble, metabólicamente inerte y extremadamente resistente a la agresión térmica o química. Su tiempo de vida media está estimado en aproximadamente 40 años y en humanos, en condiciones óptimas puede durar toda la vida, siendo el elemento más longevo de la MEC (Shapiro y cols., 1991). Sin embargo, existen varios enzimas proteolíticos que pueden degradar la elastina como algunas MMPs (Arribas y cols., 2006), las serin-proteasas (Robert, 2002) y la aspártico- y la cisteín-proteinasa (Jacob, 2003; Arribas y cols., 2006).

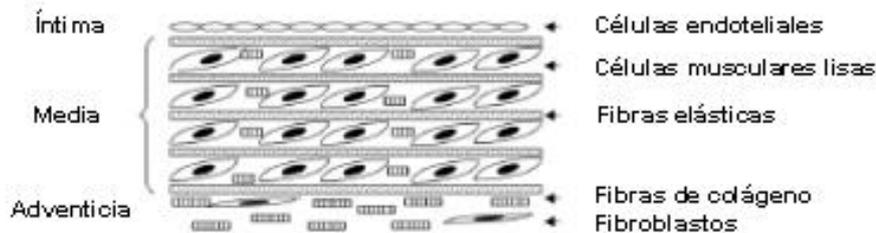
La elastina participa en la regulación de la presión arterial manteniendo una presión diastólica elevada en las arterias, ya que almacena temporalmente la energía producida por la sístole cardíaca. Cuando el ciclo cardíaco está en su punto de menor presión (diástole) libera esta energía

comprimiendo la sangre contenida y retornando el vaso al tamaño original. Así, durante la diástole la presión en los vasos no disminuye tanto como en el corazón. Esto se traduce en que las variaciones de presión en las arterias durante el ciclo cardíaco, sean de una amplitud relativamente pequeña dando lugar a un flujo continuo y a una irrigación adecuada de los órganos. Esto es de extrema importancia e induce una diferencia muy apreciable entre las presiones del corazón (120/5 mm Hg) y la aorta (120/80 mm Hg; Faury, 2001).

1.2.3 Glicoproteínas, proteoglicanos e integrinas

Las proteínas fibrosas, colágeno y elastina, se encuentran inmersas en un gel viscoelástico compuesto por diversos proteoglicanos y glicoproteínas (Figura 2). Entre los primeros se encuentran el condroitín-sulfato, el heparán-sulfato, el dermatán-sulfato y el ácido hialurónico, que proporcionan propiedades de turgencia y resistencia a la compresión. Además, también regulan la filtración, la migración y la motilidad celular y contienen receptores para enzimas y citoquinas (Jacob, 2003). El otro componente no fibroso son las glicoproteínas, entre las que se incluyen las fibronectinas y las vitronectinas. Estas glicoproteínas cumplen una función de interacción entre las células y los elementos de la MEC a través de sus receptores, las integrinas (Jacob, 2003; Figura 2). Las integrinas son una

familia de proteínas transmembrana que además de fijar las células a la MEC sirven como anclaje para el citoesqueleto (Intengan y Schiffrin, 2000).



COMPONENTES ESTRUCTURALES	MOLÉCULAS	PROPIEDADES PRINCIPALES
Fibras de colágeno	Colágenos Tipo I y III (aprox. 90 %) Colágenos Tipo V, VI, VIII, XII, XIV, XV y XVIII	Resistencia extensible
Fibras elásticas	Elastina (aprox. 90 %) Fibrilina 1 y 2, MAG 1 y 2, Emilina 1 y 2, Fibulina-5	Elasticidad
Membrana basal de las células endoteliales y de las células musculares lisas	Colágeno tipo IV Lamininas, Entactina Perlecan (HS-PG)	Filtración y resistencia
Otros componentes	Proteoglicanos: -Versican (CS-PG), hyalurano -Biglican (DS-PG), decorin (DS-PG), lumican (KS-PG) (PG pequeña) -Sindecanos (HS-PG), glipican (HS-PG) (PG asociados a células)	Hidratación, filtración, interacciones con otros componentes de la matriz extracelular, reservorio de factores de crecimiento.
	Glicoproteínas estructurales: Fibronectinas, Vitronectina	Interacciones entre células y otras moléculas de la matriz extracelular a través de integrinas
	Células de la matriz celular: Trombospondinas, SPARC, Tenascinas, Osteopontina, Proteínas de la familia CCN	Estructura, bioreactividad.

Figura 2. Componentes de la matriz extracelular (adaptado de Jacob, 2003).

2. CLASIFICACIÓN DE LAS ARTERIAS

La circulación sanguínea está construída según el principio económico de que cada vaso debe cumplir, al menos, otra función además de la conducción sanguínea. Basándose en este papel extra, los vasos sanguíneos se han subdividido en: arterias elásticas, arterias musculares de conductancia, arterias musculares de resistencia, vasos de intercambio y vasos de capacitancia (Levick, 2003). En cada clase, la pared vascular está adaptada a su papel fisiológico.

2.1 Arterias elásticas

Las arterias grandes como la aorta y la ílfaca, que en humanos presentan un diámetro entre 1 y 2 cm, tienen una pared muy distensible porque su túnica media consiste en varias láminas de elastina fenestradas que se alternan con las capas de CMLs (Figura 3). La elastina, proteína extracelular que es 6 veces más extensible que el caucho, permite que las arterias elásticas se expandan alrededor de un 10% en cada latido cardíaco acomodándose para la expulsión de la sangre. La retracción de los vasos elásticos durante la diástole transforma el flujo pulsátil en la aorta ascendente en un flujo continuo en las arterias más distales. El colágeno que es 100 veces más rígido que la elastina impide la sobredistensión del vaso. Estas

arterias juegan un doble papel fisiológico: son conductoras y reguladoras del caudal sanguíneo.

2.2 Arterias musculares de conductancia

Son arterias de mediano y pequeño calibre como la radial, las cerebrales y las coronarias (diámetro entre 0.1-1 cm en humanos), que presentan una túnica media que contiene más CMLs y es más gruesa respecto al lumen que las arterias elásticas (Figura 3). El espesor de la pared representa en la mayoría de los casos una cuarta parte del diámetro de la arteria (Ross y Glomset, 1976). La pared gruesa impide el colapso en los lugares en los que hay curvaturas afiladas como el codo y la rodilla. Las arterias musculares poseen una rica inervación autonómica. La túnica media de estas arterias está formada por láminas de CMLs entre las cuales hay fibras de colágeno y proteoglicanos. Fisiológicamente, su función es controlar la luz del vaso y regular el flujo sanguíneo.

2.3 Arterias musculares de resistencia

Las arterias de resistencia son arterias musculares de diámetro pequeño (<500 μm) situadas entre arterias y arteriolas elásticas de conducción (Figura 3). Al contrario que las arterias grandes, las arterias de resistencia influyen sobre la presión arterial media local y el flujo sanguíneo.

Dado que estos vasos controlan la resistencia al flujo, sirven como “grifos” de la circulación pudiendo aumentar o disminuir el flujo para adecuarse a la demanda local. Cuando los vasos de resistencia se dilatan, la resistencia cae y el flujo local aumenta. En cambio, la vasoconstricción aumenta la resistencia a nivel local reduciendo el flujo sanguíneo a este nivel. Las arteriolas terminales también ajustan la perfusión sanguínea a nivel capilar (Levick, 2003).

2.4 Vasos de intercambio

El intercambio de gases y metabolitos tiene lugar principalmente, en los capilares (Figura 3). Los capilares son muy numerosos y pequeños (diámetro 4-7 μm) y su pared consta de una sola capa de células endoteliales de 0.5 μm de grosor que facilita el paso de gases y metabolitos.

Parte del intercambio gaseoso tiene lugar en las vénulas pericíticas y postcapilares (diámetro 15-50 μm) que carecen de capa muscular lisa. No obstante, parte del O_2 pasa también a través de las arteriolas. Estrictamente hablando, el término *vasos de intercambio* comprende microvasos de los dos lados de la red capilar.

Aunque los capilares son muy estrechos, el lecho capilar en su conjunto presenta una resistencia al flujo baja y una caída modesta de la presión. Ello es debido al gran número de capilares estructurados en paralelo

y a su pequeña longitud (aprox 1 mm). La gran área de la sección del lecho capilar disminuye la velocidad a 0.5-1 mm/s. Como resultado, cada glóbulo rojo tarda entre 0.5 a 2 s en atravesar los capilares. Este tiempo de tránsito es suficientemente largo para que el glóbulo rojo pueda dejar O₂ y capturar CO₂ del tejido (Levick, 2003).

2.5 Vasos de capacitancia

Los vasos de capacitancia son vasos venosos que actúan como depósitos (Figura 3). Las vénulas (diámetro: 50-200 µm) y las venas difieren principalmente en tamaño y número. Tienen una pared delgada que comprende la túnica íntima, una túnica media con musculatura lisa y colágeno y la túnica adventicia. Las vénulas y las venas pequeñas son más numerosas que sus correspondientes arteriolas y arterias y su resistencia neta es muy baja. Una caída de presión de sólo 10-15 mm Hg es suficiente para conducir el gasto cardíaco de las vénulas hacia la aurícula derecha.

Dado su gran número y tamaño, las venas contienen aproximadamente, dos tercios de la sangre circulante por lo que se denominan *vasos de capacitancia*. Por otro lado, debido a que tienen una pared muy fina, se distienden o colapsan con facilidad actuando como depósitos de sangre. Además, muchas venas periféricas están inervadas por fibras nerviosas por lo que el volumen sanguíneo en el depósito venoso

puede ser controlado activamente. En situaciones de estrés, los vasos de capacitancia se contraen y desplazan la sangre al corazón y a las arterias.

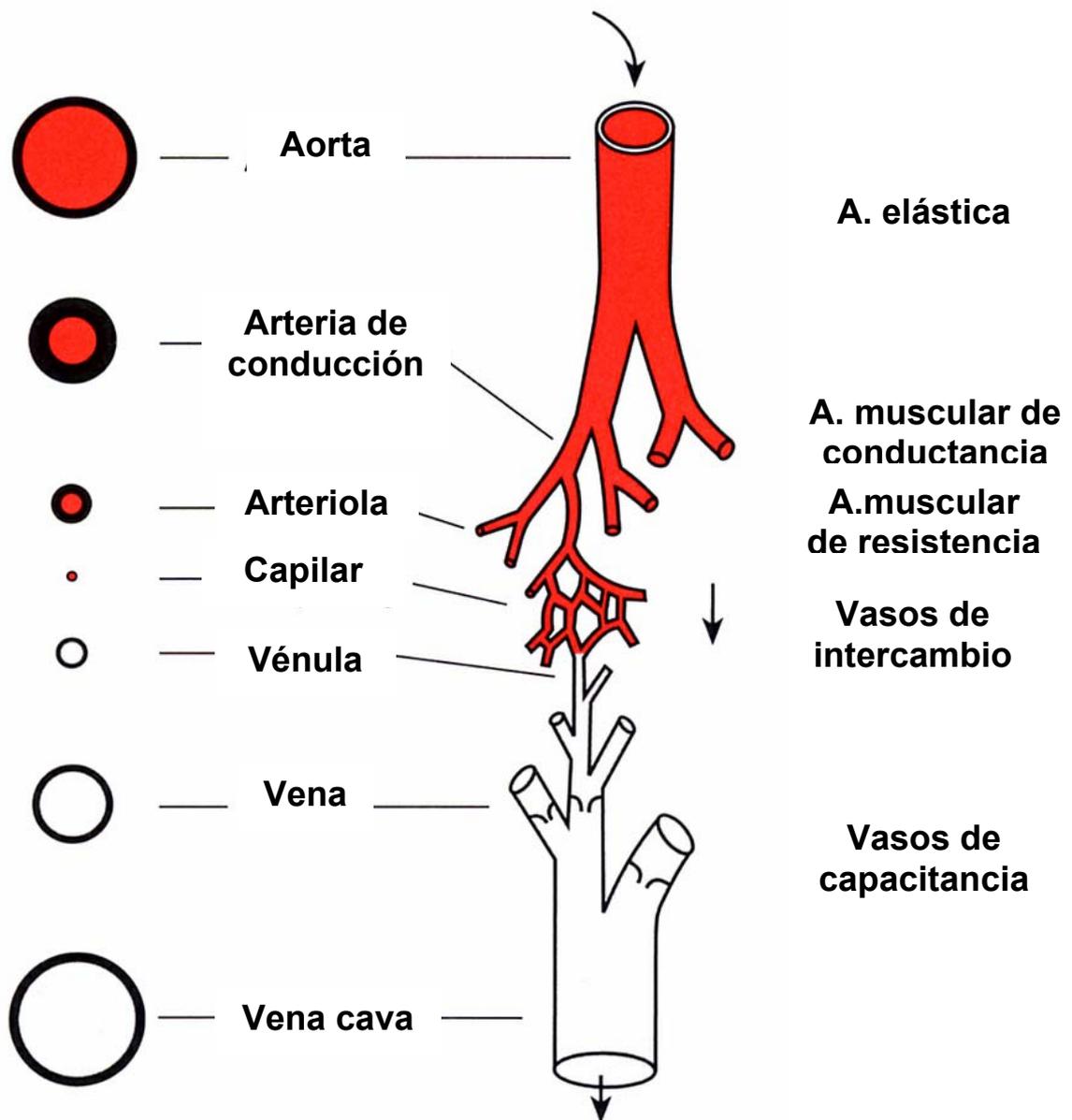


Figura 3. Diagrama representativo de la morfología de los diferentes tipos de vasos sanguíneos (adaptado de Levick, 2003).

3. MECANISMOS QUE CONTROLAN EL TONO VASCULAR

La pared vascular libera diversas sustancias de naturaleza contráctil o relajante encargadas de mantener el tono de la musculatura lisa vascular. El endotelio vascular participa dinámicamente en la función celular y de los órganos. Una de sus muchas funciones es procesar las señales que recibe traduciéndolas en mecanismos reguladores del tono del músculo liso vascular y de la resistencia periférica, contribuyendo de forma importante al control de la presión arterial (Vallance y cols., 1989). Las células endoteliales contribuyen a la regulación del tono vascular liberando diversas sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (NO), la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), que son potentes vasodilatadores, y otras, como el péptido endotelina (ET)-1, los prostanoides como el tromboxano A₂ y la prostaglandina H₂ (PGH₂), los aniones superóxido (O₂⁻) y los componentes del sistema renina-angiotensina, que son vasoconstrictores (Sánchez-Ferrer y Marín, 1990; Andresen y cols., 2006; Feletou y Vanhoutte, 2006).

3.1 Óxido nítrico

El NO es una molécula clave en el proceso de la relajación vascular. Es un gas inestable, con una vida media muy corta y muy difusible, gracias a

lo cual puede pasar fácilmente a través de las membranas (Welch y Loscalzo, 1994). El NO es sintetizado, en diversos tipos celulares, por la sintasa del NO (NOS). Se han descrito tres isoformas de la NOS: dos se expresan de forma constitutiva, la neuronal (nNOS) en células neuronales y epiteliales y la endotelial (eNOS), en células endoteliales y plaquetas. La tercera isoforma es de naturaleza inducible (iNOS) y está presente en macrófagos, neutrófilos, CMLs, células endoteliales y hepatocitos. Esta enzima necesita un estímulo inflamatorio para activarse y produce enormes cantidades de NO durante un tiempo prolongado (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997).

La activación por agonistas, como por ejemplo la acetilcolina (ACh) o la bradiquinina, de los receptores muscarínicos situados en la célula endotelial da lugar a la entrada de Ca^{2+} que activa la eNOS y sintetiza NO y L-citrulina a partir de L-arginina (Figura 4). El NO atraviesa la membrana celular y difunde a la CML donde activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) incrementando los niveles de guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc). El GMPc produce relajación por varios mecanismos entre los cuales está la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales operados por receptor (ROC), la estimulación de la Ca^{2+} -ATPasa o la activación de la proteína quinasa dependiente de GMPc que fosforila la quinasa en la cadena ligera de la miosina (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997).

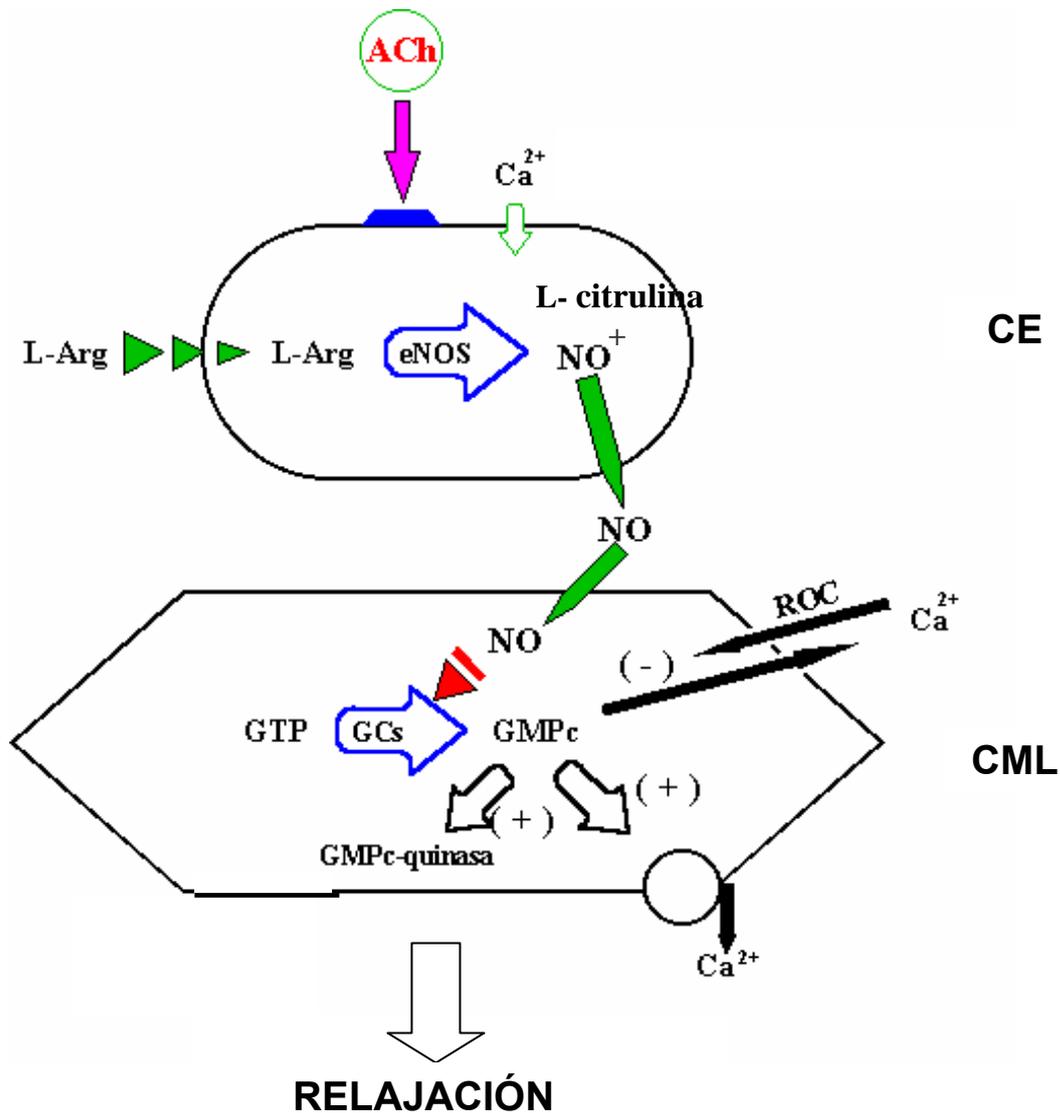


Figura 4. Biosíntesis del óxido nítrico en la célula endotelial a partir de la activación de los receptores muscarínicos por la acetilcolina. CML, célula muscular lisa; CE, célula endotelial.

3.2 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

La relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio implica, en muchos casos, hiperpolarización de la membrana celular (Garland

y cols., 1995). Teóricamente, la hiperpolarización dependiente de endotelio podría resultar de la propagación de la corriente eléctrica entre las células endoteliales y las CMLs (Christ y cols., 1996). Sin embargo, en la mayoría de los casos, esta hiperpolarización se atribuye a un factor difusible liberado por el endotelio denominado EDHF (Mombouli y Vanhoutte, 1997; Feletou y Vanhoutte, 2006). Este tipo de respuesta puede ser inducida por diversos agonistas como la bradiquinina, la ACh, la histamina o la sustancia P (Garland y cols., 1995).

La naturaleza química del EDHF aún no se ha identificado, aceptándose su participación en una respuesta vascular cuando esta respuesta permanece tras el bloqueo de la síntesis de NO y de prostanoïdes (Mombouli y Vanhoutte; 1997). Actualmente, se conoce que las respuestas mediadas por EDHF se inician con un incremento en la concentración de Ca^{2+} endotelial y la consecuente activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de pequeña e intermedia conductancia que hiperpolarizan las células endoteliales (Busse y cols., 2002). En algunos tejidos, la hiperpolarización de las células endoteliales podría estar regulada por la activación del citocromo P-450, generando ácidos epoxieicosatrienoicos. La hiperpolarización endotelial podría propagarse hacia las CMLs vecinas a través de *uniones gap*, que también podrían estar reguladas por los ácidos epoxieicosatrienóicos, o por el flujo de K^+ a través de los canales de K^+

activados por Ca^{2+} de pequeña e intermedia conductancia que podría producir la hiperpolarización de los miocitos cercanos por activación de los canales de K^+ rectificadores y/o la ATPasa Na^+ , K^+ -dependiente. Estos mecanismos no se excluyen uno al otro, sino que en algún vaso pueden ocurrir de manera simultánea o secuencial pudiendo actuar de manera sinérgica. La proporción relativa de cada mecanismo depende de numerosos parámetros como el estado de activación del músculo liso vascular, la densidad de *uniones gap* y el nivel de expresión del citocromo P-450 y de las isoformas de la ATPasa Na^+ , K^+ -dependiente y/o de los canales de K^+ rectificadores (Busse y cols., 2002).

3.3 Especies reactivas de oxígeno

El O_2^- se forma por reducción del O_2 mayoritariamente en la mitocondria, en el retículo endoplásmico y en las membranas nucleares de diferentes células (Gutteridge y cols., 1986). Este radical libre también aparece como producto de la reacción de peroxidasas (Wang y Walsh, 1995) y xantina oxidasa (Deby y Goutier, 1990). A nivel vascular, el O_2^- es generado entre otras, en las células endoteliales por la enzima circulante xantina oxidasa (Münzel y cols., 1999). Esta enzima cataliza la oxidación de la xantina y la hipoxantina, reduce el O_2 formando O_2^- y peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) y es capaz de producir grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno en condiciones patológicas (Wassmann y cols., 2004).

En los últimos años, se ha propuesto que en los vasos, la fuente más importante de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es la NADPH oxidasa (Griendling y cols., 2000; Touyz, 2004), que cataliza la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por reducción del O_2 gracias a un electrón donado por la NADPH. Esta enzima está formada por el citocromo b558 que está compuesto por dos subunidades asociadas a la membrana celular ($\text{p}22^{\text{phox}}$ y $\text{gp}91^{\text{phox}}$), tres subunidades citosólicas ($\text{p}47^{\text{phox}}$, $\text{p}67^{\text{phox}}$ y $\text{p}40^{\text{phox}}$) y la pequeña GTPasa rac1 (Brandes y Kreuzer, 2005).

Otras fuentes de producción vascular de $\text{O}_2^{\cdot-}$ incluyen la eNOS que en ausencia de suficiente L-arginina o deficiencia del cofactor tetrahidrobiopterina, actúa como una NADPH oxidasa catalizando la reducción del O_2 (Heinzel y cols., 1992; Rabelink y Luscher., 2006); las enzimas mitocondriales, citocromo P-450, ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (Münzel y cols., 1999).

La enzima encargada de mantener los niveles fisiológicos de $\text{O}_2^{\cdot-}$ es la superóxido dismutasa (SOD). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ se dismuta en H_2O_2 en un proceso catalizado por la SOD (Deby y Goutier, 1990). Se han identificado tres isoformas diferentes de la SOD: la SOD manganeso mitocondrial, la SOD cobre/cinc citosólica y la SOD extracelular. Además, existen otras enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la catalasa y la tioredoxina

reductasa (Wassmann y cols., 2004). En presencia de hierro, el H_2O_2 forma radicales hidroxilo (OH) por la reacción de Fenton y por acción de la catalasa. Por lo tanto, la catalasa indirectamente detoxifica el $O_2^{\cdot-}$. El OH da lugar a toxicidad celular (Pryor, 1986) afectando a procesos como la relajación vascular (Brandes y cols., 1999).

El NO puede reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ formando en solución acuosa peroxinitrito ($ONOO^-$), que es un potente oxidante que parece estar implicado en la oxidación de proteínas y lípidos (Welch y Loscalzo, 1994; Marín y Rodríguez-Martínez, 1995), de lipoproteínas de baja densidad (White y cols., 1994) o en fenómenos de toxicidad celular directa (Guzik y cols., 2002). Por otro lado, la formación de $ONOO^-$ podría también generar tioles nitrosilados que se comportarían como donadores endógenos de NO y podrían inducir relajación (Wu y cols., 1994) e inhibir la agregación plaquetaria (Moro y cols., 1994).

La producción de $O_2^{\cdot-}$ podría interferir en la vasodilatación de los vasos sanguíneos no sólo por la inactivación del NO (Gryglewski y cols., 1986; Touyz, 2004) sino también por alteración de los niveles de calcio (Grover y Samson, 1988; Touyz, 2005), por cambios en la expresión génica (Ito y cols., 1996) o por procesos de hipertrofia vasculares (Murrell y cols., 1990; Fortuno y cols., 2005).

3.4 Prostaciclina y otros eicosanoides

Los prostanoïdes son ácidos grasos insaturados cuyo precursor es el ácido araquidónico. Este ácido proviene de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂ y mediante la acción de la COX, se convierte en el endoperóxido de PG, PGG₂ (Griswold y Adams, 1996). La PGG₂ es convertida en PGH₂ por una endoperoxidasa, liberando radicales O₂^{·-} en el proceso (Wang y Walsh, 1995). A partir de PGH₂ y mediante enzimas específicos, se producen PG vasodilatadoras como PGI₂, PGE₂ y PGD₂ y vasoconstrictoras, como tromboxano A₂ y PGF_{2α}. Existen dos isoformas de la COX: COX-1 y COX-2. La diferencia más importante entre ambas enzimas es que la COX-1 se expresa en general en plaquetas, pero también en la mucosa gástrica (Peskar, 2005), en el timo (Smith y Langenbach., 2001), en los riñones (Khan y cols., 1998) y en arterias (Heymes y cols., 2000; Briones y cols., 2005a). Se expresa de manera constitutiva, aunque en el endotelio su expresión puede inducirse por algunos estímulos como el *shear stress* y los estrógenos (Okahara y cols., 1998; Ospina y cols., 2003). En cambio la COX-2, es una enzima inducible sobre todo, por estímulos inflamatorios y se ha encontrado expresada en las tres capas vasculares (Hernanz y cols., 2003; Briones y cols., 2005b). No obstante, aunque no se encuentra de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos, sí se expresa constitutivamente en el cerebro. Además,

recientemente se ha descrito una tercera isoforma, la COX-3 que se expresa sobre todo, en vasos cerebrales (Andresen y cols., 2006). Se ha sugerido que esta isoforma aparecería en etapas tardías del proceso inflamatorio (Willoughby y cols., 2000).

3.5 Otros mediadores

Hickey y cols. (1985) mostraron por primera vez la existencia de un péptido vasoconstrictor secretado por las células endoteliales. Posteriormente, se aisló la ET (Yanagisawa y cols., 1988), péptido de 21 aminoácidos que posee la mayor capacidad vasoconstrictora conocida (Vane y Botting, 1991). Desde entonces, se ha visto que se secreta en distintos órganos. Se han descrito 3 isopéptidos, ET-1, ET-2 y ET-3, siendo la ET-1 el más abundante a nivel vascular y el único secretado por las células endoteliales actuando de manera tanto paracrina como autocrina sobre las células adyacentes (Schiffrin, 1998; 2005). Existen dos subtipos de receptores para la ET, ET_A y ET_B, que se expresan en el endotelio y en la musculatura lisa (Arai y cols., 1990; Sakurai y cols., 1990). A nivel vascular, la ET-1 actúa sobre los receptores ET_A y ET_B que se encuentran en las CMLs donde induce sus efectos vasoconstrictores, proliferativos e hipertróficos. A nivel arterial predomina el receptor ET_A.

La angiotensina II (AII) se sintetiza por acción de la renina, enzima proteolítica liberada en el aparato yuxtaglomerular, que actúa sobre el angiotensinógeno dando lugar a angiotensina I (AI), que a su vez se convierte en AII por acción de la enzima convertidora de angiotensina. La AII produce vasoconstricción uniéndose a receptores específicos de la superficie celular. Existen dos tipos de receptores para la angiotensina, el receptor AT_1 y el AT_2 (De Gasparo y cols., 2000). En la vasculatura, los receptores AT_1 se encuentran predominantemente en las CMLs y son los que median la mayoría de los efectos cardiovasculares conocidos de la angiotensina (Dinh y cols., 2001). Los receptores AT_2 se expresan abundantemente en el feto en desarrollo mientras que en el sistema cardiovascular adulto su proporción es baja. Se ha propuesto que la estimulación de los receptores AT_2 podría antagonizar los efectos cardiovasculares mediados por los receptores AT_1 (Saavedra, 2005). Además, en los últimos años se ha demostrado que la AII es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en la pared vascular participando en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial (Ruiz-Ortega y cols., 2001; Cheng y cols., 2005).

4. PATOLOGÍAS VASCULARES

Alteraciones en el sistema neurohumoral y mecánico que controlan el tono de las arterias de resistencia y por tanto, la resistencia periférica, pueden jugar un papel importante en la patogénesis y la progresión de las enfermedades cardiovasculares. Como ya hemos comentado anteriormente, el tono vascular depende de una interrelación compleja entre las células endoteliales y las CMLs. Por ello, factores que modulen las respuestas vasculares dependientes de endotelio, afectarán significativamente la respuesta del tono muscular vascular participando en la génesis y en la aparición de diversas enfermedades cardiovasculares.

Existe cada vez más evidencia de la existencia de una relación directa entre la inflamación y el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares. Dado que las respuestas inflamatorias están asociadas a la liberación de citoquinas, éstas pueden tener un papel importante en la agresión vascular que se produce en los procesos inflamatorios (Hopkins, 2003; Allan y Stock, 2004; Chamorro, 2004; Huang y Vita, 2006). Así, en varias enfermedades vasculares como la insuficiencia cardíaca congestiva, la arterioesclerosis, el shock séptico, la diabetes, la hipertensión y la isquemia cerebral se han observado niveles elevados de citoquinas (Vila y Salaices, 2005). Por ello, se ha sugerido que los niveles plasmáticos de algunos

marcadores de inflamación como el TNF- α y la IL-1 β podrían ser clínicamente útiles para identificar individuos con alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

4.1 Endotoxemia

El shock séptico es una respuesta sistémica a una infección que va acompañada por hipotensión y por alteraciones en la perfusión (Bridges y Dukes, 2005). La reacción normal a una infección implica una serie de procesos inmunológicos complejos. El comienzo de una cascada inmunológica potente asegura en humanos una respuesta protectora a la invasión microbiana. En cambio, una respuesta inmunológica deficiente permite que la infección se instaure. Sin embargo, una respuesta excesiva o pobremente regulada debido a una liberación inadecuada de compuestos inflamatorios generados endógenamente, puede dañar al huésped. De hecho, la sepsis puede ser debida a un exceso en los mecanismos de defensa del organismo como respuesta a los microorganismos invasores, a un daño tisular extenso o a un daño producido por un proceso de isquemia-reperfusión (Van der Poll y Van Deventer, 1999). Estos mecanismos de defensa, incluyen la liberación de citoquinas, la activación de neutrófilos, monocitos y células endoteliales, además de la activación de reflejos neuroendocrinos y de proteínas plasmáticas como el complemento, las vías

intrínsecas y extrínsecas de la coagulación y el sistema fibrinolítico. Por lo tanto, el shock séptico es una respuesta inflamatoria generalizada. De hecho, todos los sistemas mediadores de la inflamación se encuentran activados durante la sepsis y la interacción de estos sistemas produce daños vasculares que dan lugar a isquemia tisular y a múltiples disfunciones en distintos órganos (Tsiotou y Sakorafas, 2004).

En infecciones severas por microorganismos Gram-negativos que desembocan en shock séptico, se desencadena la liberación de varias citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β por macrófagos, células endoteliales y CMLs (Lu y Fiscus, 1999). Esta IL juega un papel muy importante en la respuesta inflamatoria que se produce en el shock séptico, dando lugar a una disminución del tono vascular e hipotensión por un exceso en la producción de NO por activación de la iNOS (Lu y Fiscus, 1999). Además, esta citoquina produce citotoxicidad, incremento de la permeabilidad de las células endoteliales, depresión miocárdica, cardiomiopatía y empeoramiento en el flujo microcirculatorio (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Tsiotou y Sakorafas., 2004). Se ha descrito que en arterias la IL-1 β aumenta la producción de O₂⁻ (Visner y cols., 1992; Wimalasundera y cols., 2003) el cual reacciona rápidamente con el NO produciendo ONOO⁻ (Milstien y Katusic, 1999), que a su vez, reduce la biodisponibilidad del NO contribuyendo a la disminución de la relajación endotelio-dependiente (Cai y

Harrison, 2000). Esta citoquina provoca, además, un incremento en la expresión de la COX-2, produciendo un aumento de la síntesis de prostanoïdes que modulan el tono vascular (Bishop-Bailey y cols., 1999).

Aunque el shock séptico se asocia generalmente a vasodilatación, manifestada por una disminución de las resistencias periféricas, no todos los vasos se dilatan. Algunos vasos como las arteriolas permanecen contraídos lo que da lugar a una mala distribución del flujo sanguíneo (Hinshaw, 1996). Esta vasoconstricción y las alteraciones en el flujo parecen ser debidas a la formación de mediadores de la inflamación como el TNF- α y la ET (De Backer y cols., 2002).

4.2 Isquemia cerebral

La isquemia cerebral es una enfermedad degenerativa aguda que supone una de las principales causas de mortalidad e incapacidad en los países occidentales. La isquemia cerebral se caracteriza por una interrupción del flujo sanguíneo al cerebro. En humanos, existen básicamente dos tipos de isquemia cerebral en función del origen de la oclusión arterial: i) isquemia inducida por una pérdida total del flujo cerebral, como la que se produce en un paro cardíaco y que se denominan *isquemia global* y ii) isquemia en la que por bloqueo de una arteria se produce una disminución del flujo cerebral local (Hou y MacManus, 2002). Una interrupción del flujo sanguíneo en una arteria

cerebral afectará, principalmente, a sus áreas de irrigación directa. Esto es lo que se conoce como *isquemia focal*.

El daño cerebral que se produce después de una isquemia cerebral es el resultado de un conjunto de mecanismos altamente complejos que da lugar a la maduración del infarto. Dado que el cerebro necesita gran cantidad de glucosa y de oxígeno, la disminución del flujo sanguíneo produce una disminución del aporte de estos compuestos a las neuronas, dando lugar a necrosis celular y a la formación del núcleo del infarto. Entre los mecanismos que participan en el daño cerebral producido por la disminución del flujo se encuentran la excitotoxicidad, la formación de radicales libres y la acidosis tisular, a los que le siguen inflamación y apoptosis (Mergenthaler y cols., 2004). Rodeando al núcleo del infarto se encuentra un área denominada *penumbra* que es una zona de tejido moderadamente isquémico que se encuentra entre el tejido que recibe una perfusión normal y el tejido dañado. Las células de la zona de penumbra se encuentran irrigadas por arterias colaterales, por lo que si se restaura el flujo sanguíneo permanecen viables (Heiss y cols., 2004). Por ello, a pesar de que la zona nuclear es irrecuperable, la zona de penumbra es una diana para el desarrollo de estrategias terapéuticas.

Como se ha descrito anteriormente, la isquemia cerebral es un proceso vascular y metabólico complejo que da lugar a muerte neuronal.

Existen cada vez mayores pruebas de que la respuesta inflamatoria y, en consecuencia, las citoquinas producidas (Hopkins, 2003; Allan y Stock, 2004; Chamorro, 2004), juegan un papel importante en la patogénesis de la lesión cerebral que sigue a un infarto. En condiciones fisiológicas, la expresión de citoquinas como IL-1, IL-6 o TNF- α , es muy baja; sin embargo, después de un infarto cerebral, estas citoquinas se encuentran sobreexpresadas en el cerebro y en plasma (Quan y Herkenham, 2002; Chamorro, 2004). En este sentido, se ha observado que en las primeras horas después de un episodio de isquemia cerebral, la expresión de IL-1 β (Berti y cols., 2002), IL-6 (Ali y cols., 2000) y TNF- α (Legos y cols., 2002) aumenta, aunque existen discrepancias en el tiempo en que su expresión empieza a disminuir (Allan y Stock, 2004). Los incrementos en los niveles de citoquinas plasmáticos observados en modelos experimentales de isquemia cerebral se confirman en algunos estudios clínicos (Vila y cols., 2000; Castellanos y cols., 2002).

5. PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LAS ALTERACIONES VASCULARES

Las citoquinas son proteínas solubles o péptidos grandes producidos por leucocitos o por otros tipos celulares que actúan como comunicadores químicos entre células. Entre las citoquinas implicadas en la fase efectora de la respuesta inflamatoria están el TNF- α , la IL-1 y la IL-6. Además, existen

citoquinas antiinflamatorias como el TNF- β , la IL-10, la IL-4 y la IL-13. El TNF- α es una citoquina circulante multifuncional que se produce en las células endoteliales y en las CMLs así como en los macrófagos. A su vez, la IL-1 β y la IL-6 poseen un amplio rango de efectos celulares y humorales relacionados con la inflamación, la agresión tisular y la defensa del huésped. Las citoquinas inducen la expresión de genes que codifican proteínas que sintetizan otros péptidos de la misma familia o diversos mediadores como prostanoides, leucotrienos, NO, bradiquinina, ET-1 especies reactivas de oxígeno y factor activador de las plaquetas que pueden afectar a la función vascular. En la Figura 5 se han resumido los mediadores, inducidos por citoquinas, que podrían participar en los cambios en la reactividad de las arterias. Además, como hemos mencionado anteriormente, también pueden inducir la expresión de diversas enzimas como la iNOS y la COX-2 (Briones y cols., 2005b) que liberan mediadores relajadores (PGI₂, PGE₂, NO) o contráctiles (PGH₂, tromboxano A₂; TXA₂). Las citoquinas pueden también aumentar la producción de O₂⁻, que disminuirá la biodisponibilidad del NO endotelial y en consecuencia, la relajación dependiente de endotelio. La producción de ONOO⁻ debido al aumento simultáneo de O₂⁻ y de NO a partir de la iNOS, puede disminuir la expresión y/o la actividad de la eNOS. La respuesta vascular parece estar determinada por el equilibrio entre todos estos factores. Sin embargo, existen diferencias regionales en la liberación y

en la respuesta a estos factores que participan en las respuestas dilatadoras y contráctiles que se observan en un determinado lecho vascular (Vila y Salaices, 2005).

El hecho de que las citoquinas se hayan encontrado elevadas en muchas patologías cardiovasculares donde también se ha observado disfunción endotelial (Huang y Vita, 2006), apoya la relación entre inflamación y enfermedades cardiovasculares. Además, como hemos mencionado anteriormente, las citoquinas producen también disminución de respuestas vasoconstrictoras (O'Brien y cols., 2001).

Los mecanismos implicados en el empeoramiento de las respuestas contráctiles en shock séptico están bastante establecidos (Hernanz y cols., 2003; Hernanz y cols., 2004a) y son dependientes de la producción de NO, O_2^- y PGs. Sin embargo, existe menos información sobre los mecanismos que participan en el empeoramiento de las relajaciones endotelio-dependientes producido por esta citoquina en arterias de resistencia.

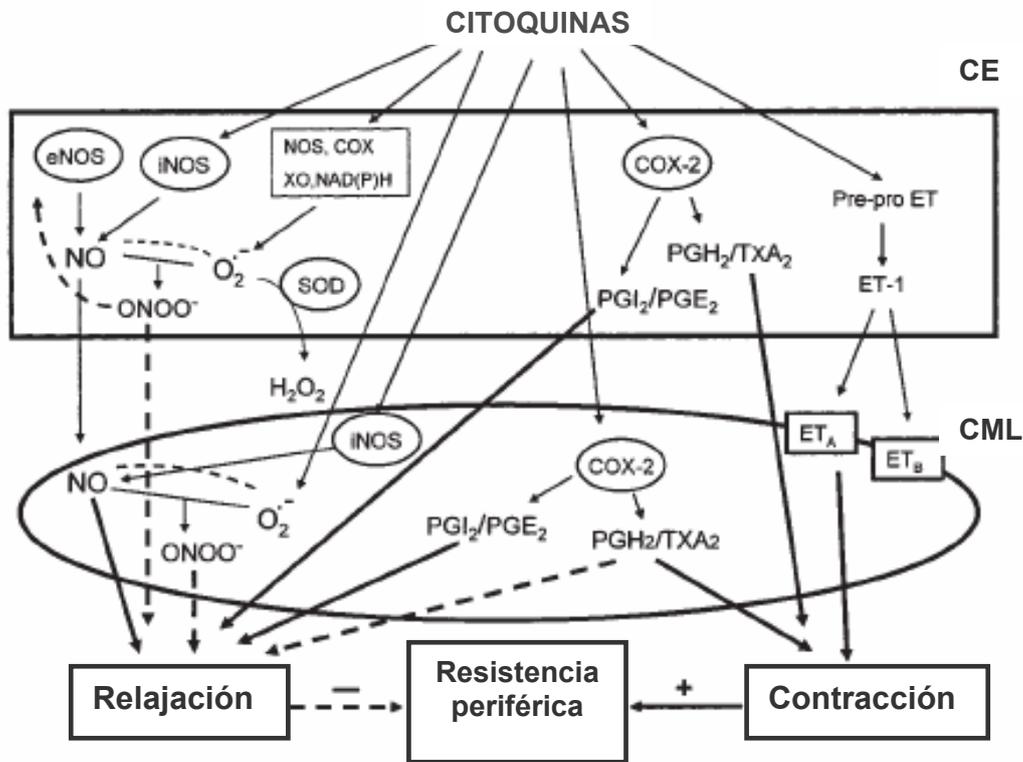


Figura 5. Mecanismos implicados en los efectos de las citoquinas sobre la reactividad vascular. Las líneas continuas representan efectos estimulantes y las discontinuas efectos inhibidores. CML, célula muscular lisa; CE, célula endotelial; XO, xantina oxidasa (adaptado de Vila y Salaices, 2005).

6. REMODELADO VASCULAR

La pared vascular es capaz de cambiar su estructura a través de un proceso denominado *remodelado* que es un proceso adaptativo que se produce como respuesta a los cambios, a largo término, en las condiciones hemodinámicas como el desarrollo o el envejecimiento. Además, este proceso de remodelado vascular también puede aparecer en la patofisiología de determinadas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión y la diabetes.

A lo largo de la última década, se han realizado importantes estudios en relación con la estructura de los vasos y los procesos de remodelado que se producen tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, con un énfasis especial en los vasos de resistencia (Mulvany y cols., 1996; Intengan y Schiffrin, 2001; Mulvany, 2002a; Schiffrin, 2004).

El concepto de remodelado vascular se ha definido como un mecanismo complejo en el que se encuentran involucrados procesos de crecimiento y atrofia (Mulvany y cols., 1996). En este sentido, el remodelado puede conllevar un incremento en la cantidad de material del vaso (*remodelado hipertrófico*), una reducción (*remodelado hipotrófico*) o una reorganización de los distintos componentes de la pared vascular sin cambio en la cantidad de material (*remodelado eutrófico*; Mulvany y cols., 1996;

Mulvany, 2002a). El remodelado además, puede ser hacia el interior (*inward*), cuando hay una reducción del diámetro interno del vaso, hacia el exterior (*outward*) cuando se produce un incremento del diámetro o compensado cuando el diámetro interno no se modifica (Figura 6). Se ha sugerido que el remodelado vascular es una respuesta adaptativa frente a diversos estímulos, como puede ser el aumento de la presión o la respuesta a determinados fármacos. En este sentido, Mulvany (2002b) propuso que el remodelado hipertrófico podría compensar el aumento en el estrés producido por un incremento de la presión arterial.

Por otro lado, el remodelado vascular se ha asociado también a cambios en las propiedades mecánicas de la pared vascular. Así, la alteración de la rigidez del vaso, si produce una reducción del diámetro interno puede afectar a la resistencia periférica y al flujo sanguíneo. Se ha sugerido que los cambios en la rigidez son fundamentalmente debidos a alteraciones en el contenido de colágeno, en las proteínas no fibrosas de la MEC, en las moléculas de adhesión (Intengan y Schiffrin, 2000) y más recientemente en las fibras elásticas (Briones y cols., 2003). A su vez, la rigidez de los componentes del vaso, la geometría del mismo y la presión intraluminal a la que está expuesto determinarán cambios en la distensibilidad vascular (Intengan y Schiffrin, 2000).

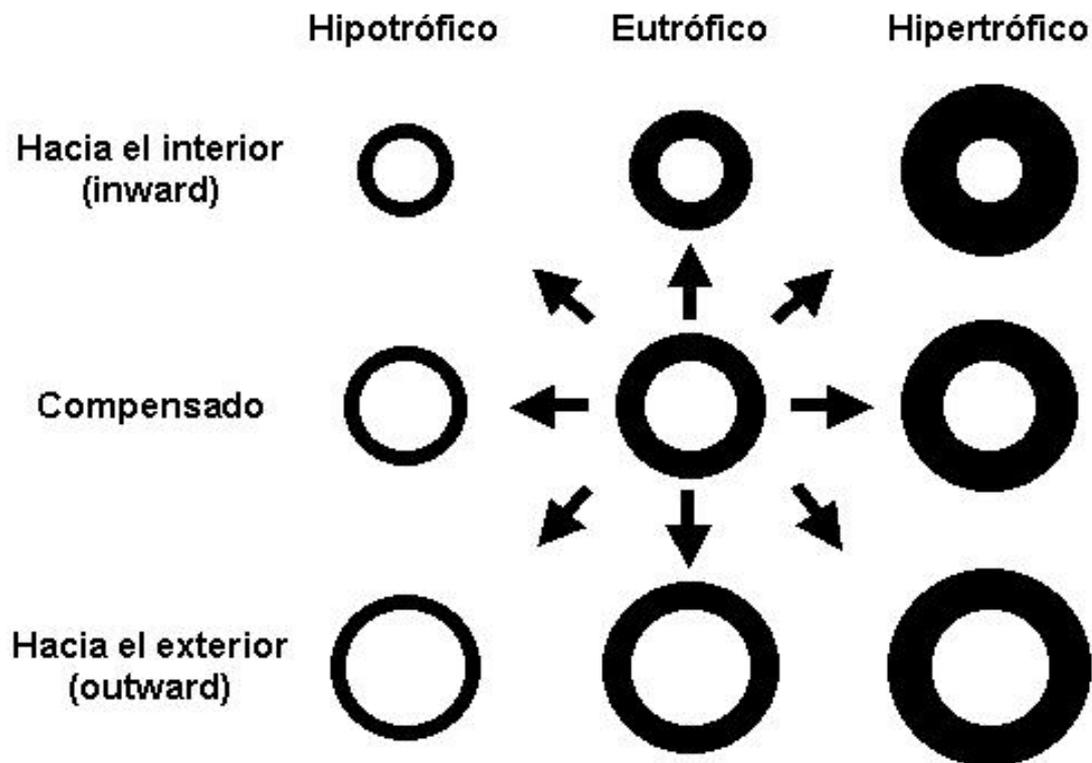


Figura 6. Tipos de remodelado vascular (adaptado de Mulvany, 2002a).

6.1 Remodelado vascular y citoquinas

Una de las muchas funciones atribuidas a las citoquinas es su participación en el proceso de remodelado (Ono y cols., 1998; Irwin y cols, 1999). En este sentido, se ha asociado la presencia de IL-1 β a una disminución del procolágeno α_1 , α_2 y del mRNA del procolágeno α_1 así como

a un aumento de la MMP-13, -2 y -9 (Siwik y cols., 2000). Estos cambios en las proteínas de la MEC producirán, a su vez, cambios en las propiedades mecánicas de los vasos que como hemos comentado anteriormente pueden participar en el remodelado vascular.

Por otro lado, se conoce que el factor estimulante del crecimiento de macrófagos es un factor quimiotáctico para los monocitos que regula las funciones efectoras de los mismos y de los macrófagos maduros y las respuestas inflamatorias estimulando la producción de otras citoquinas, moléculas de adhesión y factores de crecimiento (Stanley y cols., 1983; Wang y cols., 1988). En ratones deficientes para el factor estimulante del crecimiento de macrófagos se produjo una disminución en el remodelado de AMRs en presencia de un agente proinflamatorio como la AII (De Ciuceis y cols., 2005). Es por tanto posible, que modulando la participación de determinadas citoquinas en las respuestas inflamatorias se puedan regular los procesos de remodelado vascular.

6.2 Remodelado vascular y tono miogénico en isquemia cerebral

La isquemia-reperfusión provoca cambios en la función de las arterias cerebrales medias (ACMs). Cipolla y cols. (1997) demostraron que 24 h de perfusión después de un episodio de isquemia, causaban una disminución del tono miogénico y un empeoramiento de la relajación a ACh en ACMs

aisladas de ratas Sprague-Dawley (SD). Posteriormente, el mismo grupo (Cipolla y cols., 2001) demostró que la disrupción del citoesqueleto de actina podría ser un mecanismo implicado en el empeoramiento del tono miogénico producido por la isquemia cerebral en ACM de rata. Asimismo, se ha sugerido que el aumento de especies reactivas de oxígeno producido durante este proceso podría participar en dicho efecto (Korthuis y Granger, 1986). En este sentido, se ha identificado al ONOO^- como uno de los posibles responsables de la disrupción del citoesqueleto de actina (Maneen y cols., 2006).

La isquemia-reperfusión provoca también cambios en la estructura y mecánica vasculares. Así, Cipolla y cols. (1997) observaron que la isquemia-reperfusión producía un aumento del grosor de la pared de las ACMs comparadas con sus controles *sham*. Estas alteraciones vasculares inducidas por la isquemia parecen ser diferentes a nivel cerebral y periférico. Así, Coats (2003) demostró que las arterias de resistencia procedentes de la pierna amputada de pacientes con isquemia crítica, presentaban atrofia debido a la disminución del grosor de la pared y del área de la sección transversal.

Se ha observado que las ACMs de ratas isquémicas presentan mayor o menor rigidez en función de la duración del período de oclusión y/o perfusión comparado con sus respectivos controles *sham* (Cipolla y cols., 1997; Coulson y cols., 2002). Además, Coats (2003) encontró que las arterias

subcutáneas de pierna amputada de pacientes con isquemia crítica presentaban menor rigidez que sus controles.

Aunque existen evidencias de los posibles mecanismos implicados en el empeoramiento del tono miogénico en arterias cerebrales provenientes de ratas isquémicas, no se conocen los mecanismos implicados en el remodelado estructural y en el cambio de las propiedades mecánicas en estos vasos.

OBJETIVOS

La isquemia cerebral esta asociada a un aumento de los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias que pueden producir alteraciones funcionales, estructurales y de las propiedades mecánicas vasculares. El **objetivo general** de este trabajo ha sido estudiar las alteraciones vasculares producidas por procesos inflamatorios como la isquemia cerebral y analizar los mecanismos implicados en dichas alteraciones.

Objetivos específicos:

1. Estudiar si existen alteraciones en la estructura y en las propiedades mecánicas y miogénicas de las arterias cerebrales medias de ratas sometidas a isquemia cerebral focal.
2. Determinar los mecanismos implicados en las posibles alteraciones observadas, estudiando la estructura tridimensional y la distribución celular así como algunas proteínas de la matriz extracelular de la pared arterial.
3. Analizar si la incubación con citoquinas inflamatorias produce alteraciones en la estructura o en las propiedades mecánicas de arterias mesentéricas de resistencia.
4. Analizar si la incubación con citoquinas produce alteraciones en la respuesta vasodilatadora en arterias mesentéricas de resistencia.

5. Determinar los mecanismos implicados en las posibles alteraciones funcionales observadas tras la incubación con citoquinas, así como el papel del estrés oxidativo en dichas alteraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado ratas Wistar Kyoto (WKY; Janvier, Francia) y SD (estabulario de la Universidad Autónoma de Barcelona) de 3 y 4 meses de edad, respectivamente.

Los experimentos realizados con animales sometidos a isquemia cerebral focal han sido aprobados por el Comité de Ética del “Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer” (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universitat de Barcelona) y los experimentos realizados con tejidos procedentes de ratas WKY y SD fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universitat Autònoma de Barcelona, ajustándose a las directivas de la Comunidad Europea: Real Decreto 223/1988.

2. MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

Se ha utilizado el método descrito por Cervera y cols. (2004). Las ratas se anestesiaron (2 min) con una mezcla de halotano (4%) con protóxido de nitrógeno (70%) y oxígeno (30%). A continuación, se intubó la traquea para mantener al animal con respiración asistida y se canuló la arteria femoral izquierda para medir la presión arterial. La temperatura corporal, controlada con una sonda rectal, se mantuvo a 37 ± 0.5 °C, mediante una

manta eléctrica. La respiración asistida permite variar el volumen y el ritmo respiratorio y así controlar la presión arterial. El catéter situado en la arteria femoral permite obtener muestras de sangre y medir los valores de pH y presión de gases en sangre arterial a lo largo de todo el proceso. Una vez controlados todos los parámetros, se procedió a abrir el campo de cirugía. Se colocaron retractores que separaron los músculos esternomastoidal, digástrico y esternoidal. Justo debajo se encuentra el punto de bifurcación de la arteria carótida común en arteria carótida externa e interna. El primer paso consistió en electrocoagular y cortar las ramas laterales de las arterias carótida externa, tiroidea superior y occipital, para proceder a ligar la arteria pterigopalatina, de manera que sólo quedara abierta a la circulación la arteria carótida interna. Por debajo de la mandíbula encontramos el punto donde la arteria carótida externa se bifurca en las arterias maxilar y lingual. Se procede a electrocoagular y cortar el punto de bifurcación; el segmento de arteria carótida externa nos servirá de guía para la introducción del monofilamento (monofilamento de nylon, 4/0 Suturas Aragón) con el extremo redondeado y engrosado. Con dos clips de microcirugía se pinzan la arteria carótida común y la arteria carótida externa, de manera que podamos trabajar en el segmento distal de ésta últimas sin peligro de hemorragia. Se realiza una incisión en el extremo de la arteria carótida externa y se introduce el monofilamento, que aseguramos con un hilo de sutura ligado alrededor de la arteria carótida

externa. Se retira el clip de la arteria carótida externa y se hace resbalar el filamento de nylon unos 22 mm, de manera que la parte más gruesa de éste quede justo en el lugar donde nace la ACM (Figura 7). Transcurridos 90 min, en los animales isquémicos, y menos de 1 minuto, en los animales control (*sham*), se retira el clip de la arteria carótida común y se deja que la rata se recupere de la anestesia, hasta el momento de su sacrificio, 24 h después.

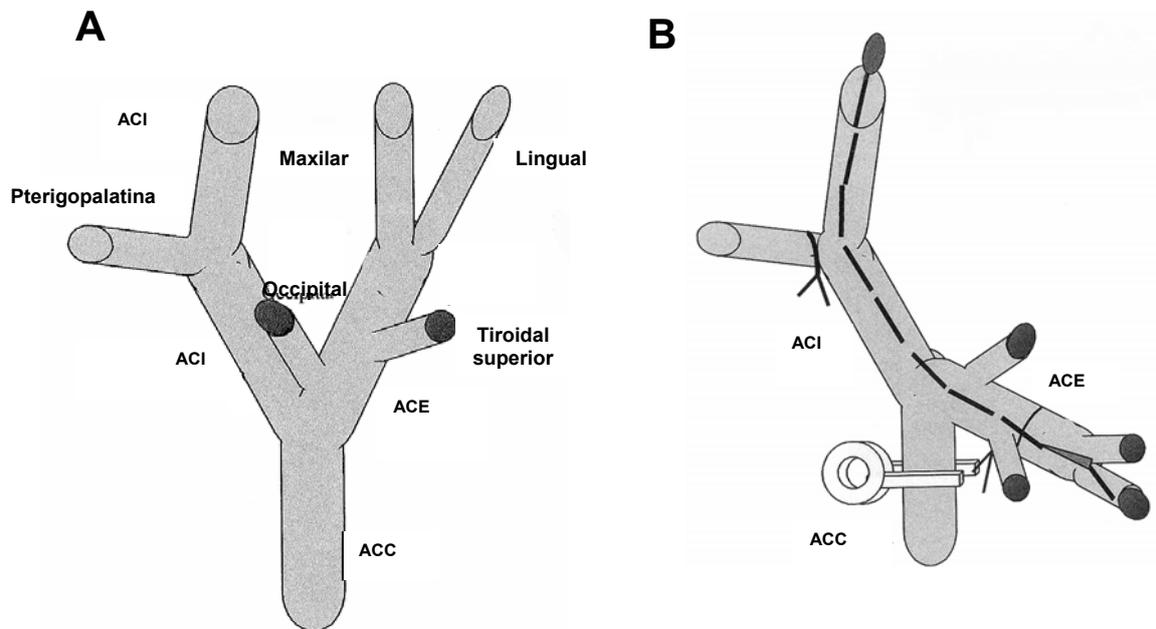


Figura 7. Diagrama representativo de las distintas arterias cerebrales antes (A) y durante (B) la oclusión. ACC, arteria carótida común; ACE, arteria carótida externa; ACI, arteria carótida interna.

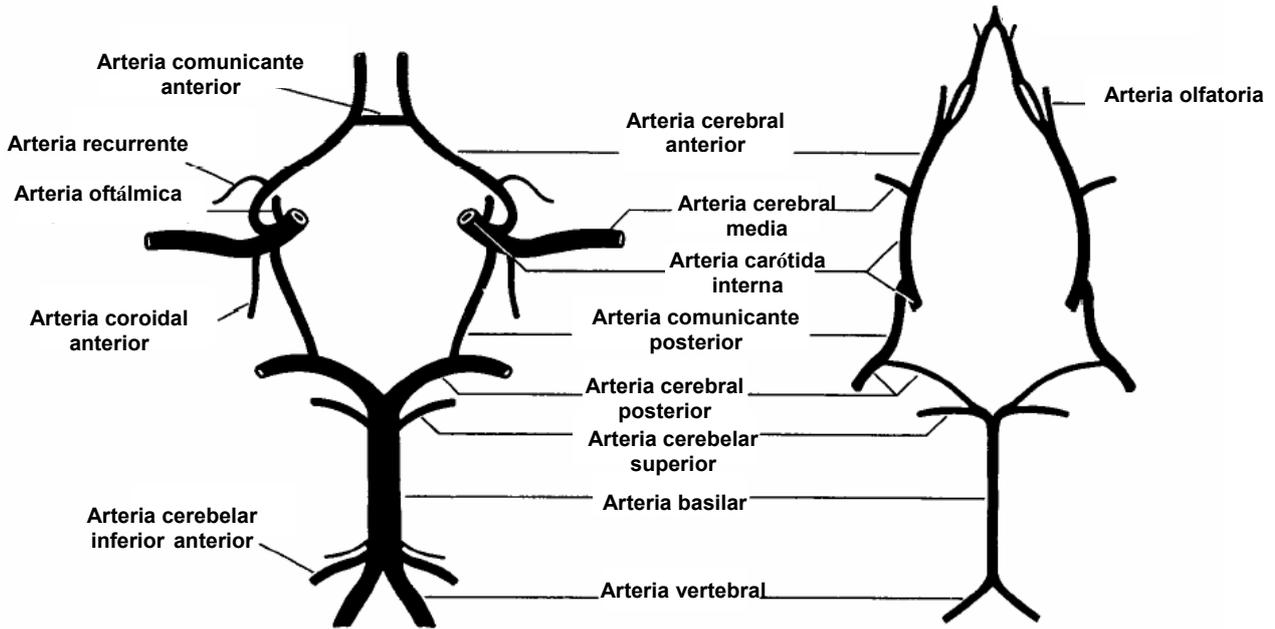
3. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las ratas se sacrificaron por decapitación en ausencia, ratas SD, o en presencia, ratas WKY sometidas a un episodio de isquemia-reperfusión, de anestesia. Se desangraron y se extrajo el lecho mesentérico de las ratas SD o el cerebro de las ratas WKY manteniéndose a 4 °C en solución de Krebs-Henseleit (KH) oxigenada (95% O₂, 5% CO₂; pH 7). Posteriormente, se procedió a la disección de las dos ACM y de la 2^a y 3^a rama de la arteria mesentérica superior. La disposición anatómica de las arterias situadas en la base del cerebro y en el lecho mesentérico está esquematizada en la Figura 8. Las ACMs, tanto del lado ipsilateral (lado en el que se produce la oclusión de la ACM), como del lado contralateral (lado opuesto al que se produce la oclusión de la ACM), fueron cuidadosamente disecadas y mantenidas en solución de KH oxigenado (95% O₂, 5% CO₂) a 4 °C hasta el momento de su utilización. La 2^a y 3^a rama de la arteria mesentérica superior fueron aisladas, limpiadas de tejido adiposo y separadas de la vena que les acompaña siempre mantenidas en una solución de KH oxigenada (95% O₂ y 5% CO₂, 4 °C).

4. EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO

Secciones transversales (2 mm) del cerebro de ratas sometidas a isquemia-cerebral y de ratas *sham* se tiñeron durante 10 min con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC; 2%; 37 °C) y se fijaron con paraformaldehído (PFA, 4%) durante 24 h. Las áreas infartadas se midieron para cada sección (mm^2) con un sistema de análisis de imagen (Image Research) y las áreas se integraron para obtener el volumen de infarto (mm^3).

A



Humanos

Rata

B

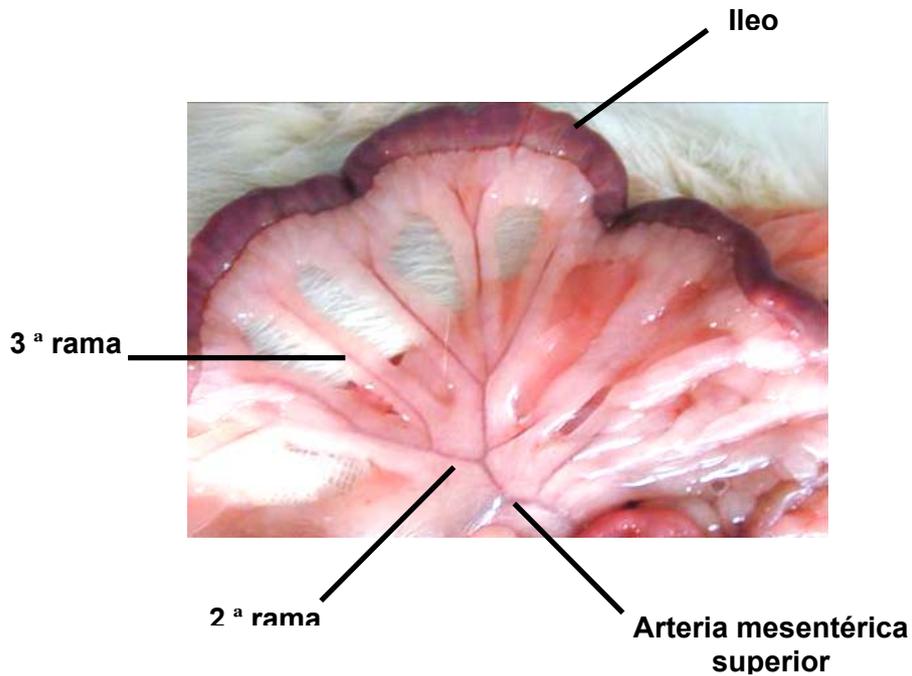


Figura 8. Distribución anatómica de la circulación cerebral (adaptado de Lee, 1995; A) y mesentérica (B).

5. CULTIVO TISULAR

En los experimentos de miografía de presión, de producción de O_2^- y de inmunofluorescencia se utilizaron segmentos de la 3ª rama (arterias mesentéricas de resistencia; AMRs) de la arteria mesentérica superior. Para los experimentos de Western Blot y para medir la producción de nitritos se utilizaron segmentos de la 2ª y 3ª ramas de la arteria mesentérica. En ambos casos, los segmentos arteriales se lavaron tres veces con tampón fosfato (PBS) suplementado con penicilina (1000 U/ml) y estreptomicina (1 mg/ml; Pen-Estrep). Las arterias se estabilizaron durante una hora en medio de cultivo suplementado con Pen-Estrep (200 mM) y suero fetal bovino (1%). Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio de cultivo en presencia o ausencia de IL-1 β (10 ng/ml) y las arterias se mantuvieron en incubación durante 14 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5%). En algunos experimentos, al medio de incubación se le añadió un inhibidor de la xantina oxidasa, 4-hidroxipirazolo[3,4-*d*]pirimidina (alopurinol; 1 mM), un inhibidor de la NADPH oxidasa, 4-hidroxi-3-metoxiacetofenón (apocinina; 0.3 mM), un inhibidor específico de la iNOS, N-3-aminometilbencilacetamida (1400W; 1 μ M) o un inhibidor inespecífico de la NOS, N^o-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME; 100 μ M). El protocolo utilizado en este experimento se resume en la Figura 9.

Después de las 14 h de incubación, las arterias se trasladaron a una solución de KH oxigenado a 4 °C durante una hora y el medio de cultivo se utilizó para la determinación de nitritos. A continuación, la 2ª y 3ª ramas se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70 °C hasta el día del experimento de Western Blot. Por otro lado, las AMRs se montaron en un miógrafo de perfusión en el que se realizó el protocolo descrito más adelante (sección 6.2). Una vez finalizados los experimentos en el miógrafo de perfusión, un grupo de arterias se fijó a una presión intraluminal de 70 mm de Hg durante 1 hora en PFA (4%; pH=7.4). Las arterias se lavaron con PBS (3 veces; 10 min), se mantuvieron durante toda la noche en una solución de sacarosa (30%) en PBS y a continuación, se congelaron y se guardaron a -70 °C hasta el día del experimento de inmunofluorescencia (protocolo de conservación, Figura 9). Un segundo grupo de arterias, utilizado para la determinación de O_2^- , se sometieron al mismo proceso de conservación descrito anteriormente pero sin fijación previa (Figura 9).

Este modelo de cultivo tisular se eligió para evitar las alteraciones fenotípicas de las CMLs que pueden aparecer en cultivo celular y para preservar las interacciones célula-célula y célula-matriz que se producen *in vivo*. Los vasos se incubaron en condiciones de cultivo estériles para estudiar el efecto de la IL-1 β en la reactividad vascular sin la interferencia de otras endotoxinas contaminantes.

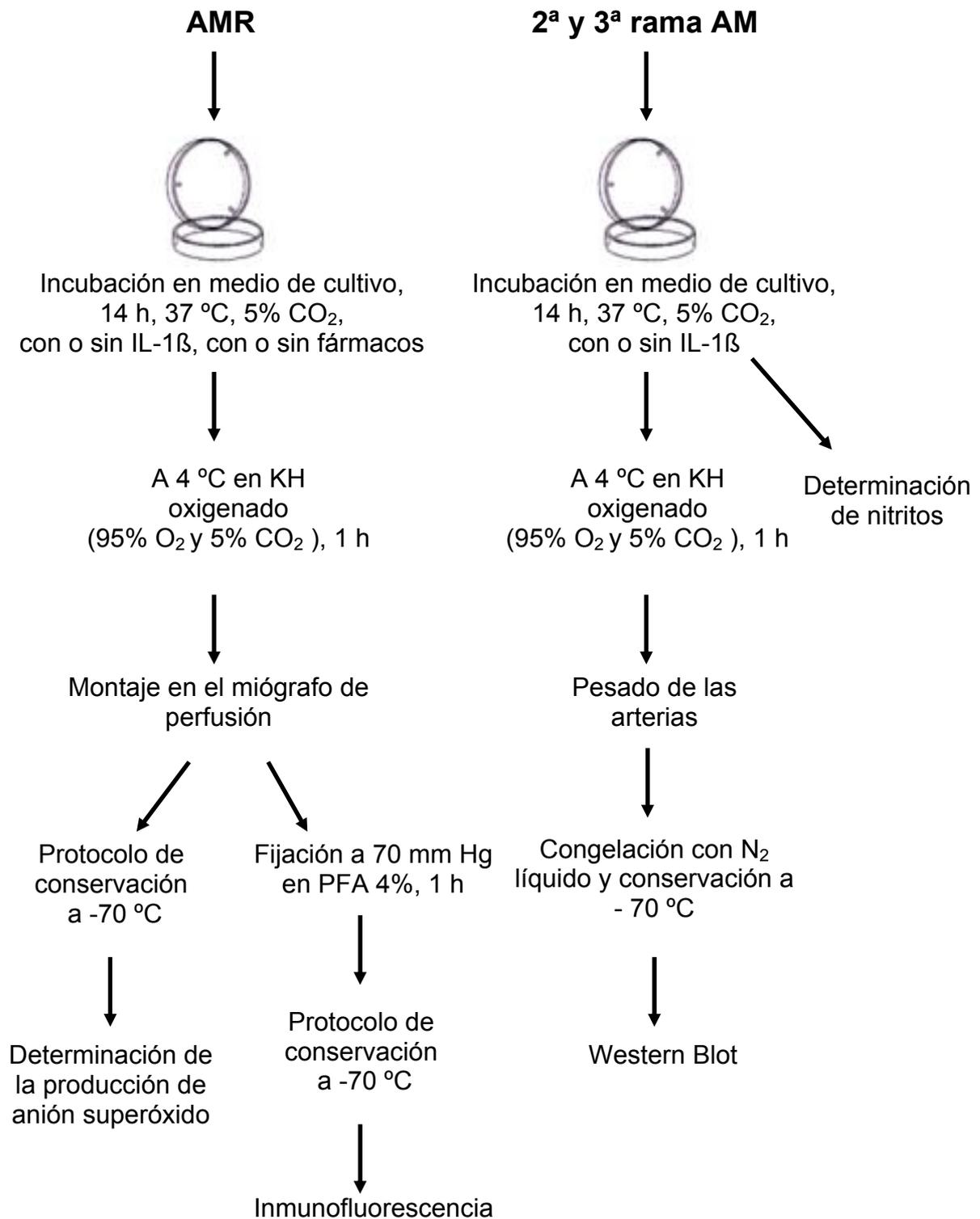


Figura 9. Representación esquemática de los protocolos y las técnicas utilizadas en los experimentos de arterias mesentéricas cultivadas.

6. MIOGRAFÍA DE PERFUSIÓN

6.1 Características generales

Para el estudio de la reactividad vascular y de las propiedades estructurales, mecánicas y miogénicas se utilizó el método descrito por Coats y Hillier (1999). Para ello, las arterias sumergidas en una solución de KH se montaron entre dos microcánulas de vidrio en un baño de perfusión para vasos pequeños acoplado a un miógrafo de perfusión (Danish Myo Tech, modelo P100; J. P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca; Figura 10). Después de comprobar que todas las ramas arteriales laterales estuvieran atadas, las paredes del vaso se ajustaron hasta que estuvieron paralelas. Posteriormente, se aumentó la presión intraluminal hasta 140 mm Hg y la pared vascular se volvió a ajustar en paralelo. A continuación, se disminuyó la presión intraluminal a 70 mm Hg y se estabilizó la preparación durante 30 min a 37 °C, antes de realizar los experimentos.

El sistema de miografía de perfusión permite medir los cambios en el diámetro externo e interno del vaso en condiciones que se asemejan a las condiciones fisiológicas.

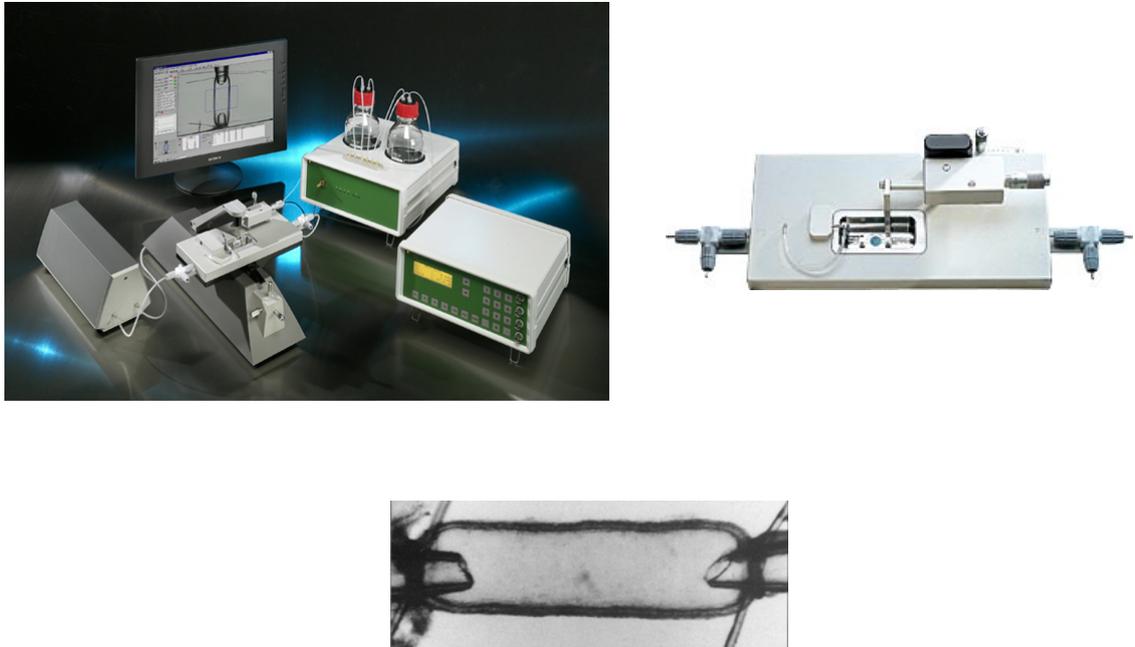


Figura 10. Componentes del miógrafo de presión (arriba izquierda) y del baño de perfusión (arriba derecha). Arteria cerebral presurizada en un baño de perfusión (abajo).

6.2 Estudios estructurales, mecánicos y de tono miogénico

El protocolo experimental seguido en estos experimentos se esquematiza en la Figura 11 y se resume a continuación.

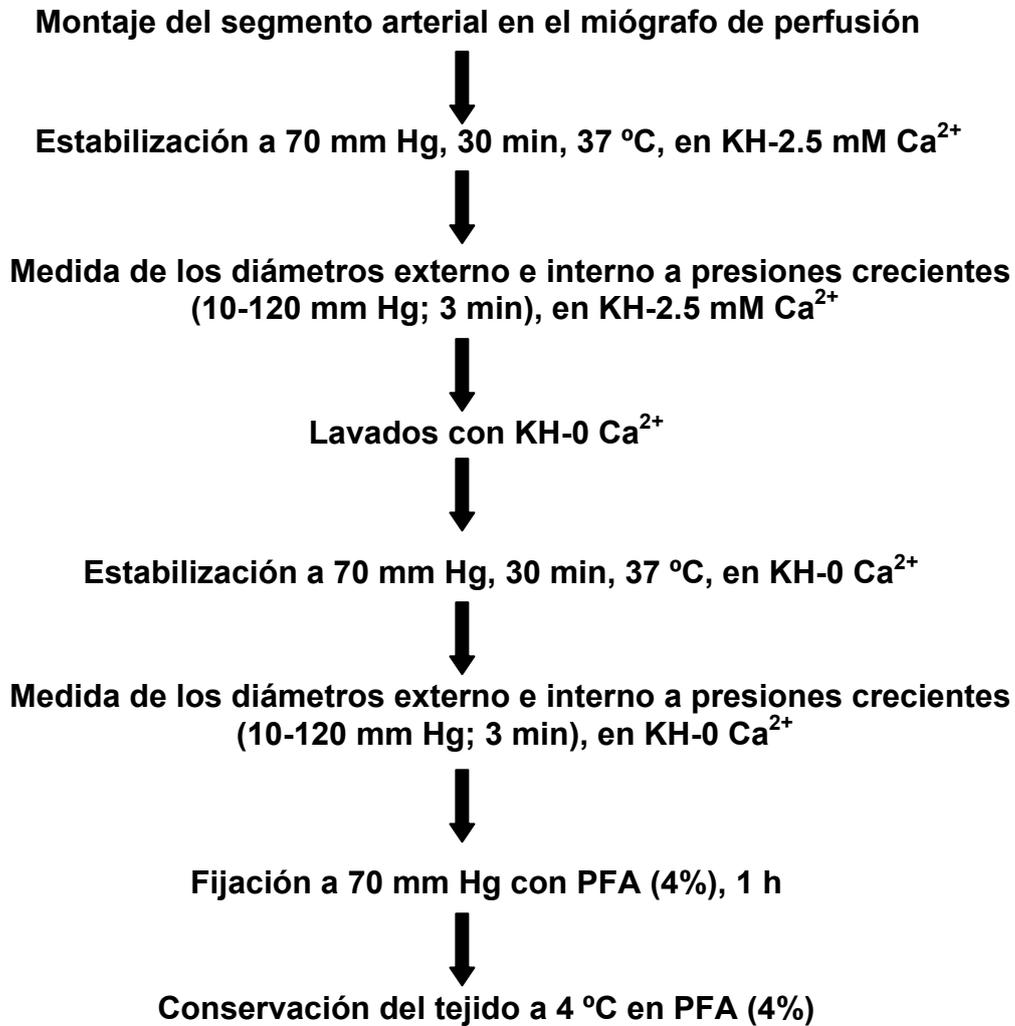


Figura 11. Protocolo experimental utilizado en los experimentos de estructura, mecánica y tono miogénico.

Se tomaron medidas del diámetro externo e interno a presiones intraluminales crecientes en una solución de KH (2.5 mM Ca^{2+}). A continuación, se lavó la preparación con una solución de KH que carecía de Ca^{2+} (KH-0 Ca^{2+}) para obtener una relajación máxima. La arteria se mantuvo durante 30 min a 70 mm Hg de presión intraluminal en la solución de KH-0 Ca^{2+} . Posteriormente, se realizó una segunda curva a presiones intraluminales crecientes en KH-0 Ca^{2+} . Finalmente, las arterias se fijaron con PFA (4%; 1h) a 70 mm Hg de presión intraluminal y se almacenaron en PFA (4 °C) hasta el día de su utilización para los diversos experimentos. El estudio de los cambios de diámetro en condiciones activas (KH-2.5 mM Ca^{2+}) ofrece datos sobre la capacidad funcional del segmento arterial; en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}), permite el estudio de la estructura general y de las características mecánicas pasivas de la arteria, debido a que no se produce contracción de las fibras musculares por ausencia de Ca^{2+} . La relación entre las condiciones activas y pasivas determina el tono intrínseco del vaso.

6.2.1 Parámetros estructurales

Los parámetros estructurales se han calculado con los datos obtenidos en condiciones pasivas mediante las siguientes ecuaciones:

- **Grosor de la pared:** $(D_{e0\text{Ca}} - D_{i0\text{Ca}}) / 2$
- **Relación pared:luz:** $(D_{e0\text{Ca}} - D_{i0\text{Ca}}) / 2D_{i0\text{Ca}}$

- **Área de la sección transversal (AST):** $(\pi/4) \times (D_{e0Ca}^2 - D_{i0Ca}^2)$

Donde D_{e0Ca} y D_{i0Ca} son el diámetro externo e interno a cada presión en una solución de KH-0 Ca^{2+} .

6.2.2 Parámetros mecánicos

Las características mecánicas vasculares están determinadas por los componentes pasivos, principalmente colágeno y elastina. También contribuyen de manera desconocida otros componentes no fibrosos de la MEC como los proteoglicanos, las células endoteliales, los fibroblastos y las terminaciones nerviosas de la adventicia.

Estos parámetros se han determinado en condiciones pasivas según el método de Baumbach y Heistad (1989).

- **Estrés circunferencial de la pared (σ):** Es la fuerza por unidad de área ejercida por la pared en sentido opuesto a la fuerza ejercida por la presión arterial (Dobrin, 1978). Se expresa en (N/m^2 , dinas/cm²).

$$\sigma = (P \times D_{i0Ca}) / (2 \times \text{Grosor de la pared})$$

Donde P es la presión intraluminal (1 mm Hg = 1.334×10^2 N/m²).

- **Tensión (ε):** Es el incremento fraccional en el diámetro de un vaso cuando se somete a una presión intraluminal.

$$\varepsilon = (D_{i0Ca} - D_{00Ca}) / D_{00Ca}$$

Donde D_{00Ca} es el diámetro a 10 mm Hg y D_{i0Ca} es el diámetro interno a las distintas presiones.

- **Relación Estrés-Tensión:** La relación estrés-tensión es el módulo elástico de Young (E).

$$E = \sigma/\varepsilon$$

Esta relación proporciona una medida de la rigidez intrínseca de un tejido independientemente de la geometría (Dobrin, 1978).

La relación estrés-tensión (σ/ε) no es lineal por lo que es más apropiado calcular el módulo elástico tangencial o incremental (E_{inc}) a través de la pendiente de la curva estrés-tensión ($E_{inc}=d\sigma/d\varepsilon$; Dobrin, 1978). Para determinar la rigidez intrínseca de un tejido, el E_{inc} se calcula aproximando los datos de la relación estrés-tensión de cada animal a una curva exponencial usando la ecuación:

$$\sigma_{orig} \exp (\beta\varepsilon)$$

Donde σ_{orig} es el estrés en el diámetro inicial (diámetro a 10 mm Hg). Realizando la derivada de dicha ecuación se obtiene $E_{inc} = \beta\sigma$. Para un valor determinado de σ , β es directamente proporcional a E_{inc} . Un incremento en β implica un incremento en E_{inc} , que significa un incremento en la rigidez intrínseca.

La relación estrés-tensión en arterias es una curva exponencial. Esta característica se debe a la distinta participación de la elastina y el colágeno

en la mecánica del vaso. La primera parte de la curva representa el comportamiento de la elastina, ya que ésta proteína empieza a estirarse a presiones intraluminales bajas. La elevada distensibilidad de la elastina determina que cambios pequeños de presión (estrés) produzcan grandes cambios de diámetro (tensión). La segunda parte de la curva, con mayor pendiente, refleja el comportamiento de la elastina ya estirada y del colágeno, el cual al ser mucho más rígido, no permite grandes cambios en las dimensiones del vaso, aunque el aumento de presión sea grande (Dobrin, 1978).

6.2.3 Parámetros miogénicos

Las propiedades activas de un vaso están determinadas por el nivel de activación y por la cantidad, el tamaño y la organización de las CMLs.

Se han determinado los siguientes parámetros:

- **Diámetro normalizado:** Es la relación entre el diámetro en condiciones activas y el diámetro en condiciones pasivas a una determinada presión intravascular. Este parámetro determina el tono miogénico o capacidad del vaso de contraerse ofreciendo resistencia al aumento de diámetro producido por el incremento de presión intraluminal. Se calcula según la siguiente ecuación:

$$100 \times D_{ICa} / D_{I0Ca}$$

Donde D_{iCa} es el diámetro interno a cada presión en una solución de KH-2.5 mM Ca^{2+} .

6.2.4 Estudios de reactividad

Para los estudios funcionales se utilizaron segmentos de AMR de aproximadamente 2 mm de longitud procedentes de ratas SD como se ha descrito previamente. Así, se utilizaron arterias recién extraídas del lecho mesentérico del animal (Frescas) y arterias incubadas en medio de cultivo durante 14 h en ausencia (Control) y en presencia de IL-1 β . Estos segmentos se montaron en un miógrafo de presión para vasos pequeños y se estabilizaron a 70 mm Hg durante 30 min a 37 °C en una solución de KH oxigenado. Transcurrido el período de estabilización, la contractilidad de las arterias se comprobó mediante exposición de las mismas a una solución de elevada concentración de K^+ (KCl, 100 mM). Después del período de lavado, los segmentos se estabilizaron durante 45 min antes de la realización de los siguientes protocolos experimentales.

En una primera serie de experimentos, se realizaron curvas concentración-respuesta de relajación consecutivas a ACh (1 nM-10 μ M) y a nitroprusiato sódico (NPS; 0.01 nM-1 mM) en las arterias precontraídas con fenilefrina (FE; 2 μ M) procedentes de los tres grupos experimentales.

Para comprobar la participación del $O_2^{\cdot-}$ en el efecto inducido por IL-1 β sobre la respuesta relajadora a ACh o a NPS, algunos segmentos se incubaron con el barredor de $O_2^{\cdot-}$, SOD (150 U/ml; 30 min) o con su análogo permeable, polietilenglicol SOD (PEG-SOD; 200 U/ml; 2 h).

Para comprobar el origen enzimático del $O_2^{\cdot-}$, algunas arterias controles e incubadas con IL-1 β fueron coincubadas durante toda la noche y durante el desarrollo del experimento con alopurinol (1 mM) o con apocinina (0.3 mM). Además, para comprobar la participación del NO en la respuesta relajadora a ACh, algunos segmentos fueron incubados con L-NAME (100 μ M) o con 1400W (1 μ M).

Finalmente, en otro grupo de experimentos se realizaron curvas concentración-respuesta consecutivas al análogo del GMPc, 8-bromoguanosina 3' 5'-monofosfato cíclico (8-BrGMPc; 10 nM-1 mM) y a papaverina (0.1 μ M – 0.1 mM), en arterias precontraídas con FE (2 μ M).

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN ENZIMÁTICA

7.1 Western Blot

La 2ª y 3ª rama de la arteria mesentérica superior se homogeneizaron en una solución tampón (99 °C) con inhibidores de proteasas y se determinó la cantidad de proteínas presentes por el método de Lowry y cols. (1951)

modificado. En un sistema de electroforesis (Mini-Protean II, Electrophoresis Cell; BioRad, Hercules, CA, EUA) se polimerizaron dos geles de SDS-poliacrilamida: *Gel 1* o separador y *Gel 2* o concentrador. Se cargaron 25 µg de proteína en el gel concentrador y a continuación, las proteínas del gel se sometieron a electroforesis durante 2 h a una intensidad constante de 115 V (Power Pac 200; BioRad) en una *solución de electroforesis*. Junto con las muestras, se cargaron en el gel marcadores de peso molecular de amplio rango (BioRad) preteñidos. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF Transfer membrane, Hybond P; GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) durante 19-20 h (230 mA).

Después de la transferencia, la membrana se incubó a temperatura ambiente con una *solución bloqueante*, para evitar la adsorción no específica de reactivos no inmunológicos. A continuación, la membrana se incubó (1h, temperatura ambiente) con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-iNOS o anti-eNOS (1:10000 y 1:2500, respectivamente; BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) o con los anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-GCs (1:1000; Alexis Biochemicals, Nottingham, RU) o anti-xantina oxidasa (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). El exceso de anticuerpo primario se lavó con una *solución de lavado* y se incubó con el anticuerpo secundario (1h; temperatura ambiente) IgG anti-ratón o anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (1:2000; BD Biosciences).

Después de varios lavados, los inmunocomplejos se detectaron mediante una reacción de quimioluminiscencia de peroxidasa de rábano/luminol aumentada (ECL Plus; GE Healthcare). Las membranas se pusieron en contacto con una película fotográfica (Hyperfilm ECL; GE Healthcare) en la que quedaron impregnadas las bandas para su posterior revelado. Estas bandas se cuantificaron por análisis densitométrico usando el software BioRad GS700 y Molecular Analyst 1.5 (BioRad). La misma membrana se usó para determinar la expresión de β -actina (1:15000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina. El control de β -actina se utilizó para corregir la expresión de las proteínas determinadas. Como control positivo de la iNOS se utilizaron macrófagos estimulados de rata.

7.2 Inmunofluorescencia

Secciones transversales (14 μ m) de la AMR se obtuvieron con un criostato y se colocaron en un portaobjetos gelatinado. Después de 60 min de secado se bloquearon con PBS que contenía 5% de albúmina sérica bovina. Las secciones se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-iNOS (1:100) o anti-xantina oxidasa (1:1000; Lab Vision, Fremont, CA, EUA) o un anticuerpo primario policlonal de cabra anti-subunidad p22^{phox} de NADPH oxidasa (1:100, Santa Cruz Biotechnology) en PBS que contenía 2%

de albúmina sérica bovina, durante una hora a 37 °C en una cámara húmeda. Después de los lavados, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (1h, 37°C) IgG anti-ratón o anti-cabra conjugado con CyTM3 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA) en una cámara húmeda. Después de los lavados, las señales inmunofluorescentes se visualizaron en un microscopio laser confocal (Leica TCS 4D, Wetzlar, Alemania) con lentes de inmersión en aceite (40X; Leica). El anticuerpo conjugado con CyTM3 se visualizó por excitación a $\lambda = 568$ nm y emisión a $\lambda = 600-700$ nm. La autofluorescencia de la elastina de la LEI se observó por excitación a $\lambda = 488$ nm y emisión a $\lambda = 560$ nm.

La especificidad de la señal se evaluó por omisión del anticuerpo primario y se procesó como indicamos anteriormente. En estas condiciones, no se observó tinción en la pared vascular en ninguna de las situaciones experimentales.

8. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

Para evaluar la producción *in situ* de O_2^- en muestras de AMR y ACM se utilizó la oxidación de la sonda fluorescente hidroetidina (HE) siguiendo la técnica descrita previamente (Miller y cols., 1998). La HE es un agente permeable a las membranas celulares que en presencia de O_2^- se oxida para

dar bromuro de etidio, que a su vez se intercala en el ADN; el bromuro de etidio es excitado a $\lambda = 546$ nm y tiene un espectro de emisión a $\lambda = 610$ nm.

Secciones transversales de 14 μm de grosor de AMR y ACM no fijadas y previamente congeladas como se ha descrito en la sección 5, se incubaron en una solución de KH-HEPES (30 min; 37 °C; pH 7.4). A continuación, dichas secciones se incubaron con HE (2 μM) en ausencia o en presencia de PEG-SOD (500 U/ml; 30 min) en una cámara húmeda a 37 °C y en un ambiente protegido de la luz. Secciones transversales de arterias coincubadas con alopurinol (1 mM) o apocinina (0.3 mM) se procesaron de la misma manera. La visualización se realizó mediante microscopía confocal de fluorescencia usando los mismos parámetros de adquisición de la imagen en todas las condiciones experimentales.

Para la cuantificación de la señal fluorescente se calculó la densidad óptica integrada de cuatro áreas por sección.

9. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NITRITOS

La segunda y tercera rama de la arteria mesentérica superior se incubaron a 37 °C en medio de cultivo durante 14 h en ausencia (Control) y en presencia de IL-1 β como se ha descrito anteriormente (sección 5). La determinación de nitritos se realizó en dicho medio de cultivo. El ensayo se

basa en la detección colorimétrica de nitritos como un producto rojo de la reacción de Griess que absorbe luz visible a 540 nm (Green y cols, 1982). La concentración de nitritos se determinó interpolando en una curva de calibración de concentraciones conocidas de nitrito sódico frente a absorbancia. La concentración de nitritos se corrigió por el peso de las arterias.

10. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

Para el estudio de la estructura general de la pared vascular y de la distribución celular se utilizó un microscopio confocal Leica acoplado a un microscopio invertido con fuentes de láser argón y helio-neón (Figura 12). Este microscopio confocal es un microscopio espectral que permite seleccionar la longitud de onda de emisión.

El microscopio confocal tiene la ventaja de proporcionar secciones de la arteria sin necesidad de realizar cortes histológicos. De cada sección óptica, se captura una imagen de gran nitidez puesto que cada sección recoge la luz emitida sólo por el plano enfocado sin interferencia de la luz procedente de planos adyacentes (Figura 13).



Figura 12. Microscopio confocal Leica modelo TCS SP2.

Las ACMs presurizadas y fijadas, se montaron intactas con FluoroGuard™ (glicerol: antidecolorante) en un portaobjetos con un pocillo de silicona. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite de 63X y apertura numérica 1,3.

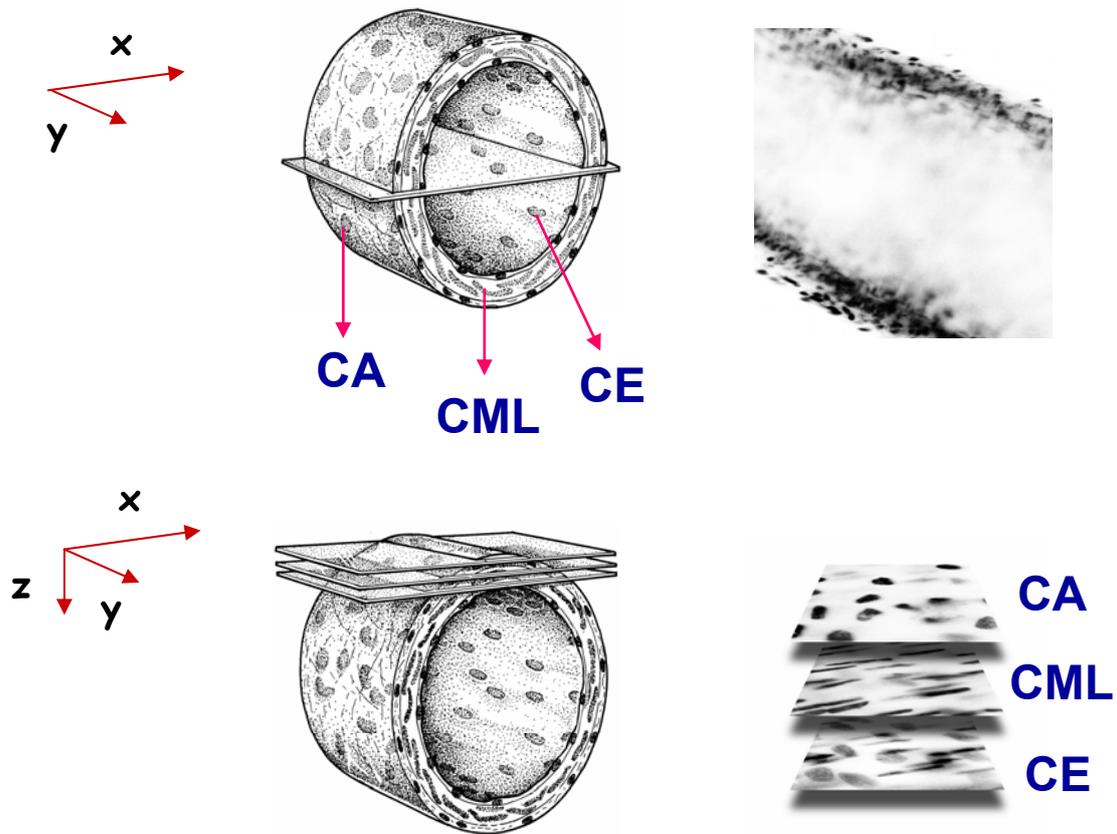


Figura 13. Esquema de la obtención de secciones ópticas con un microscopio confocal de fluorescencia de una arteria teñida con un colorante nuclear (adaptado de Arribas y cols., 1997b). CA, células adventicias; CML, células musculares lisas; CE, células endoteliales.

El conjunto de imágenes capturado en el eje z mediante el microscopio confocal, se procesó con un programa de análisis de imagen (Metamorph; Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) que permite obtener una proyección bidimensional del tejido objeto de estudio. Esta proyección, rotada en el espacio, permite la visualización tridimensional

de la arteria. Asimismo, el programa permite cuantificar la intensidad de fluorescencia.

10.1 Estudio de la estructura general y de la distribución celular de la arteria cerebral media

Las diferentes capas de los vasos pequeños teñidos con colorantes nucleares pueden ser claramente distinguidas por microscopía confocal teniendo en cuenta la forma y la orientación de los núcleos celulares (McGrath y cols., 1995). Dichos colorantes poseen la ventaja de mostrar las células como objetos individuales, lo que permite obtener información del número de células en cada capa y del área de los núcleos celulares.

Para este estudio se utilizaron arterias fijadas con PFA (4%) a una presión intraluminal de 70 mm Hg en condiciones pasivas. Los segmentos se incubaron (10 min) en la oscuridad con el colorante nuclear Hoechst 33342 (10 μ M; λ_{exc} = 345 nm; λ_{em} = 460 nm) y se montaron para su visualización mediante microscopía confocal (Arribas y cols, 1999; Briones y cols., 2006).

Se captaron imágenes seriadas en el eje z de las distintas capas de la pared vascular (adventicia, media e íntima) con un objetivo de 63X y zoom 1X con una distancia entre planos de 0.5 μ m.

Para la medida del grosor de las distintas capas se tomó como primera imagen de cada una de las capas, aquella en la que aparece el primer núcleo de una célula en su máxima intensidad de fluorescencia. De

manera similar se determinó la imagen en la que aparecía la última célula de cada capa (Arribas y cols., 1997b). Para poder comparar los vasos, los diferentes cálculos se realizaron en base a segmentos de 1 mm de longitud.

De cada conjunto de imágenes, se analizaron los siguientes parámetros:

- **Volumen de la pared:** AST de la pared x 1 mm
- **Volumen de cada capa:** AST de cada capa x 1 mm
- **Área de la superficie luminal:** $(2 \pi \times \text{diámetro interno})/2$
- **Número de células de cada capa por mm de longitud del vaso:** Se determinó contando el número de núcleos que aparecen en las imágenes seriadas correspondientes a cada capa y calculado por mm de longitud. El **número de células endoteliales** se calculó respecto al área de la superficie luminal de un vaso de 1 mm de longitud (número de células endoteliales/mm² de imagen) x (área de la superficie luminal).

10.2 Estudio de la distribución de la elastina de la lámina elástica interna

Para el estudio de la distribución y organización tridimensional de la elastina de la LEI en la pared de la ACM se utilizaron segmentos arteriales fijados en PFA (4%) a una presión intraluminal de 70 mm Hg en condiciones pasivas.

La obtención de imágenes de elastina en el microscopio confocal se basa en las propiedades autofluorescentes de la misma. Esta proteína se excita a $\lambda = 488$ nm y emite fluorescencia a $\lambda = 500-560$ nm (Wong y Langille, 1996; Briones y cols, 2003). Se tomaron imágenes seriadas de la LEI en el eje z con un objetivo de 63X y zoom 3 con una distancia entre planos de 0.4 μm .

A partir de la proyección media en el eje z de los planos correspondientes a la LEI (Figura 14), se han obtenido los siguientes parámetros:

- **Grosor de la LEI (μm)**
- **Número de fenestras por mm de longitud de la LEI**
- **Área de las fenestras (μm^2)**
- **Intensidad de elastina por píxel:** Este parámetro estima la concentración de elastina, basándose en el principio de que la fluorescencia emitida por la elastina es directamente proporcional a su concentración (Blomfield y Farrar, 1969). Para esta cuantificación, en cada arteria se realizó el promedio de las fluorescencias obtenidas en distintas regiones de la proyección de la LEI.
- **Cantidad total de elastina (fluorescencia total):** Es el volumen ocupado por la elastina en 1 mm de vaso por la intensidad de fluorescencia media por píxel.

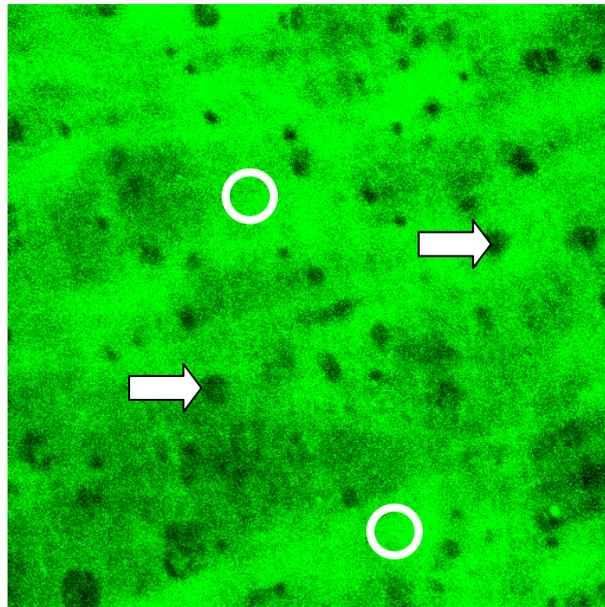


Figura 14. Imagen representativa de la proyección media tridimensional de la lámina elástica interna de arteria cerebral media presurizada de ratas WKY. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio láser confocal (objetivo: 63X; zoom: 3X). Las flechas señalan fenestras y los círculos el área ocupada por la elastina. Dimensiones de la imagen 79 x 79 μm .

11. DETERMINACIÓN DE COLÁGENO Y DE ELASTINA MEDIANTE ROJO SIRIO Y VERHOFF VAN GIESON

Secciones transversales (14 μm) de ACMs se obtuvieron con un criostato y se colocaron en un portaobjetos gelatinado. Después de 60 min de secado, se lavaron con agua y se realizaron las distintas tinciones para el estudio del colágeno o de la elastina.

11.1 Tinción de colágeno

La tinción de colágeno se realizó según el método descrito por Izzard y cols (2003). Las arterias se incubaron 30 min con rojo sirio (0.1%) en solución acuosa saturada de ácido pícrico. Una vez montadas, las preparaciones se visualizaron en un microscopio de luz polarizada circular (100X) acoplado a una cámara digital.

11.2 Tinción de elastina

La tinción de elastina se realizó según el método descrito por Bancroft y Stevens (1982). Las arterias se tiñeron durante 10 min con *tinción elástica* (Kit Accustain®; Sigma-Aldrich). Después de aclarar con agua destilada se realizó la diferenciación con cloruro férrico. Tras comprobar en el microscopio que la diferenciación era correcta, los cortes se lavaron con alcohol (95%) y con agua desionizada, para posteriormente, teñir durante 3 min con la tinción de Van Gieson. Después de un lavado con alcohol (95%), se procedió al montaje y visualización de la arteria en un microscopio óptico (100X) acoplado a una cámara digital.

12. SOLUCIONES

12.1 Fisiológicas

Las soluciones descritas en este apartado se expresan todas en concentración mM.

Solución de KH (2.5 mM Ca^{2+}): NaCl 112.0, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, KH_2PO_4 1.1, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25.0, Glucosa 11.1.

Solución de KH 100 mM de KCl: solución de KH en la que el NaCl fue reemplazado por KCl en proporción equimolar.

Solución KH en ausencia de Ca^{2+} (0 Ca^{2+}): solución de KH en la que se omite el $CaCl_2$ y se le añade EGTA 10.

Solución KH-HEPES: NaCl 130, KCl 5.6, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 0.24, HEPES 8.3, glucosa 11.

Solución de PBS (pH=7.4): $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 50, NaCl 136.9.

12.2 Western Blot

Solución para homogeneizar: vanadato sódico 1 mM, lauril sulfato sódico (SDS) 1%, tris (pH=7.4) 10 mM.

Gel 1 o separador: tris (pH=8.8) 4.6%, SDS 0.1%, acrilamida 7.5%, glicerol 3.4%, persulfato amónico (APS) 0.038%, temed 0.033%.

Gel 2 o concentrador: tris (pH=6.8) 1.49%, SDS 0.1%, acrilamida 3%, APS 0.98%, temed 0.053%.

Solución de electroforesis: tris 25 mM, glicina 200 mM, SDS 1%.

Solución de transferencia: tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%, SDS 0.05%.

Solución de lavado: NaCl 0.5 M, tris (pH=7.5) 20 mM, tween 20 0.1%.

Solución bloqueante: solución de lavados (NaCl 100 mM, tris pH=7.5 10 mM, tween 20 0.1%), leche desnatada en polvo 5%.

12.3 Determinación de nitritos

El reactivo de Griess está formado por dos soluciones:

Solución A: ácido fosfórico 8%, sulfanilamida 4.5%.

Solución B: dihidroclorato N-(1-Naftil)-etilendiamina 0.45%.

Nitrito sódico 100 mM.

12.4 Paraformaldehído

Solución A: paraformaldehído 8%.

Solución B: solución fosfato (pH=7.4) 100 mM (fosfato monosódico·1H₂O 0.24%, fosfato ácido disódico·12H₂O 0.97%).

13. FÁRMACOS Y REACTIVOS

4-hidroxi-3-metoxiacetofenón (apocinina), 4-hidroxi-pirazolo[3,4-d]pirimidina (alopurinol), 8-bromoguanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (8-BrGMPc), ácido 4-(2-Hidroxietil)-piperacín-1-etano-sulfónico (HEPES), clorhidrato de acetilcolina, clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de papaverina, cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), etilén glicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-ácido tetraacético (EGTA), N-3-aminometilbencil-acetamidina (1400W), N^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), nitroprusiato sódico, persulfato de amonio (APS), polietilén glicol-superóxido dismutasa, rojo sirio 3FB, superóxido dismutasa, temed y vanadato sódico fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA); Interleuquina-1 β de Roche Diagnostics (Barcelona, España); 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperacínil)-2, 5'-bi-1H-benzimidazol (Hoechst) y la hidroetidina de Molecular Probes (Invitrogen, Eugene, OR, EUA); acrilamida, FluoroGuardTM y tween 20 de BioRad (Hercules, CA, EUA); lauril sulfato sódico (SDS) y tris de USB Corporation (Staufen, Alemania); dihidroclorato N-(1-Naftil)-etilendiamina y sulfanilamida de Merck (Darmstadt, Alemania); y ECL de GE Healthcare (Buckinghamshire, RU).

Todos los fármacos utilizados en este estudio se disolvieron en agua bidestilada excepto SOD y PEG-SOD disueltos en KH-2.5 mM y alopurinol en NaOH (1 M).

Todos los productos químicos empleados fueron de pureza adecuada para análisis suministrados por Merck y Panreac.

14. EXPRESIÓN DE LOS DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La relajación producida por los agonistas se expresó como porcentaje de incremento en el diámetro interno en arterias precontraídas con fenilefrina y se calculó con la siguiente expresión:

$$\% \text{ Relajación} = (LD_1 - LD_2) / (LD_3 - LD_2) \times 100$$

Donde LD_1 es el diámetro interno para una determinada concentración de agonista, LD_2 es el diámetro interno en ausencia de agonista y LD_3 el diámetro interno previo a la contracción con FE.

La expresión proteica se formuló como la relación entre las señales en el inmunoblot correspondiente a las distintas proteínas analizadas (eNOS, iNOS, xantina oxidasa y GCs) y la de β -actina.

Todos los resultados se expresan como $\text{media} \pm \text{e.s.m.}$ de la media. El número (n) de ratas se indica en los pies de figura. La dependencia de la respuesta relajadora a la concentración-presión y al tratamiento, se determinó por un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (concentración-presión y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración. Cuando el factor tratamiento fue significativo, se analizaron las diferencias entre los pares de curvas (tratamientos) usando el test de contraste apropiado dentro del test de ANOVA. La diferencia entre tratamientos en la expresión de proteínas (Western Blot) y en la producción de nitritos se analizó por ANOVA de una vía. La diferencia en la producción de O_2^- entre los distintos tratamientos se analizó o bien por un ANOVA de una vía mediante el test de Tukey para múltiples comparaciones o bien por un test de la *t* de Student para datos pareados. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de valores de $p < 0.05$. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico SAS/STAT 8.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Capítulo I. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES, MECÁNICAS Y MIOGÉNICAS DE LAS ARTERIAS CEREBRALES MEDIAS

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE INFARTO

La tinción de las secciones cerebrales de ratas WKY con TTC mostró que habían sufrido un infarto cerebral focal tras una oclusión (90 min) de la ACM, seguida de un período de reperfusión de 24 h (Figura 15A), siendo el volumen medio del infarto de 63.1 ± 10.4 mm³. En cambio, como se puede ver en la Figura 15B, las secciones cerebrales de ratas WKY *sham* (oclusión <1 min) confirmaron la ausencia de infarto cerebral focal.



Figura 15. Fotografías representativas del volumen de infarto en ratas WKY sometidas a un proceso de isquemia (90 min)-reperfusión (24 h; n=13) (A) y ratas *sham* (Control; n=8) (B). El tejido infartado aparece en blanco y el tejido vivo aparece teñido por el TTC.

2. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LA GEOMETRÍA DE LAS ARTERIAS CEREBRALES

La Figura 16 muestra el efecto del aumento de la presión intraluminal sobre el diámetro externo e interno de la ACM de ratas WKY en condiciones pasivas. Tanto el diámetro externo (Figura 16A) como el interno (Figura 16B) aumentaron de forma dependiente de la presión en todos los vasos estudiados. El diámetro externo de las arterias ipsilaterales de ratas isquémicas fue superior al de las arterias de ratas *sham* (Figura 16A). Los vasos ipsilaterales y contralaterales de ratas isquémicas y los vasos de ratas *sham* mostraron un diámetro interno similar (Figura 16B).

La isquemia-reperfusión aumentó el grosor de la pared (Figura 17A), el AST (Figura 17B) y la relación pared:luz (Figura 17C) de la ACM ipsilateral sin que se modificaran de forma significativa estos valores en las arterias contralaterales cuando se comparó con las ratas *sham*. Además, el AST y el grosor de la pared de las arterias ipsilaterales, fue superior al de las arterias contralaterales. No obstante, la relación pared:luz de las arterias contralaterales fue similar a las arterias ipsilaterales. En la Figura 17 puede observarse que los valores de las arterias contralaterales de ratas isquémicas fueron siempre ligeramente superiores a los de las ratas *sham*, aunque las diferencias no fueran en ningún caso estadísticamente significativas.

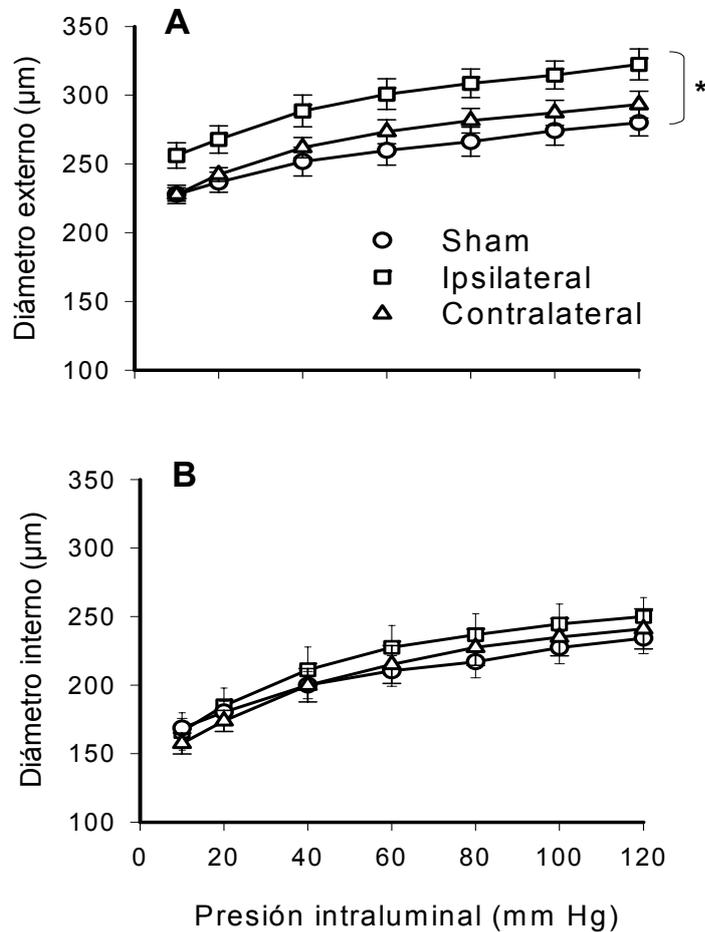


Figura 16. Efecto de la presión intraluminal sobre el diámetro externo (A) y el diámetro interno (B) en ACM de ratas *sham* e isquémicas. Los experimentos se realizaron en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}) Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-8 animales. * $p < 0.05$ ipsilateral vs *sham* o contralateral mediante ANOVA de dos vías (presión y tratamiento) con medidas repetidas en el factor presión.

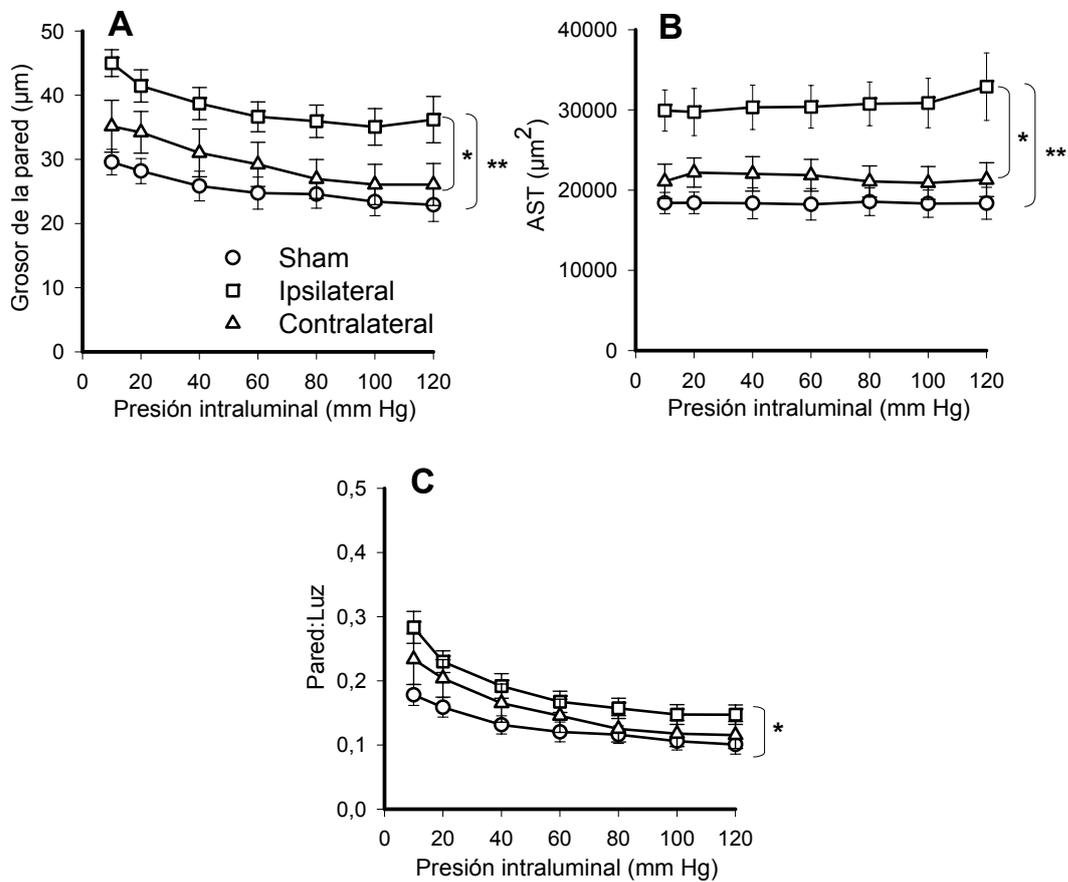


Figura 17. Efecto de la presión intraluminal sobre el grosor de la pared (A), el área de la sección transversal (AST; B) y la relación pared:luz (C) en ACM de ratas *sham* e isquémicas. Los experimentos se realizaron en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}). Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-8 animales. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ ipsilateral vs *sham* o contralateral mediante ANOVA de dos vías (presión y tratamiento) con medidas repetidas en el factor presión.

3. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LA MECÁNICA DE LAS ARTERIAS CEREBRALES

La Figura 18 muestra los parámetros mecánicos de la ACM de ratas *sham* y del lado ipsilateral y contralateral de ratas isquémicas. Las arterias ipsilaterales de ratas isquémicas presentan menor rigidez que las arterias de ratas *sham* como se demuestra por la disminución del valor del parámetro β (*sham*: 8.18 ± 0.50 ; ipsilateral: 6.36 ± 0.56 ; $p < 0.05$) y por el desplazamiento hacia la derecha de la curva estrés-tensión (Figura 18A). No obstante, ni el desplazamiento hacia la derecha, ni la disminución en el parámetro β (*sham*: 8.18 ± 0.50 ; contralateral: 6.81 ± 1.04) observado en arterias contralaterales alcanzó niveles de significación estadística al compararlos con los valores obtenidos en las arterias de ratas *sham*. Además, las diferencias observadas entre arterias contralaterales e isquémicas (Figura 18A) no alcanzaron niveles de significación estadística.

Las arterias ipsilaterales de ratas isquémicas mostraron valores inferiores de estrés cuando se compararon con sus arterias contralaterales o con los controles *sham* (Figura 18B). En cambio, los valores de estrés en los vasos contralaterales fueron similares al de los vasos de ratas *sham*.

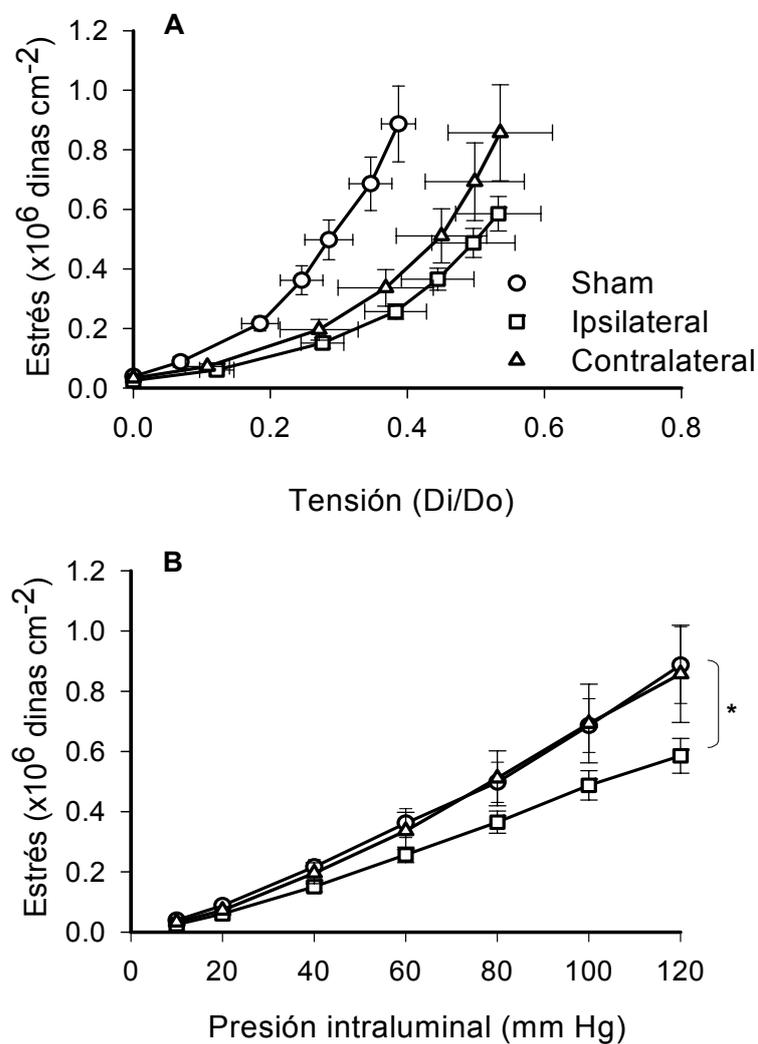


Figura 18. Relación estrés-tensión (A) y efecto de la presión intraluminal sobre el estrés de la pared (B), en ACM de ratas *sham* e isquémicas. Los experimentos se realizaron en condiciones pasivas (KH-0 Ca^{2+}). Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-8 animales. * $p < 0.05$ ipsilateral vs *sham* o contralateral mediante ANOVA de dos vías (presión/tensión y tratamiento) con medidas repetidas en el factor presión/tensión.

4. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE EL TONO MIOGÉNICO DE LAS ARTERIAS CEREBRALES

En condiciones activas, el incremento de la presión intraluminal no aumentó significativamente el diámetro externo o interno de las arterias procedentes de ratas *sham* e isquémicas. En estas condiciones, las arterias ipsilaterales y contralaterales de ratas isquémicas presentaron un mayor diámetro externo e interno que las arterias de ratas *sham* a lo largo de todo el rango de presiones estudiado (Figuras 19A y 19B).

El tono miogénico en función de la presión expresado como diámetro normalizado fue menor en los vasos ipsilaterales y contralaterales de ratas isquémicas comparado con los vasos de ratas *sham* (Figura 19C) indicando así que la isquemia cerebral reduce el tono intrínseco de las arterias.

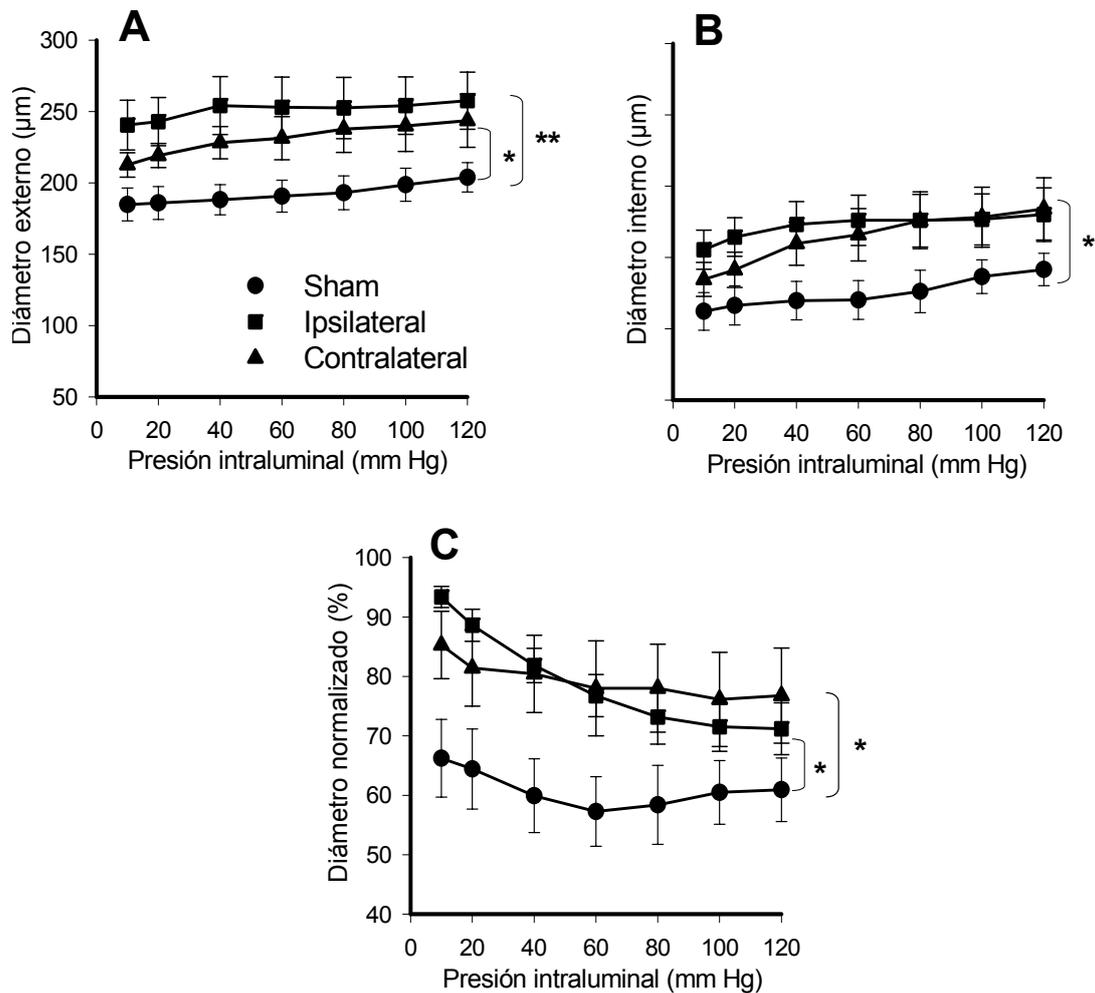


Figura 19. Efecto de la presión intraluminal sobre el diámetro externo (A), el diámetro interno (B) y el diámetro normalizado (C) en condiciones activas (KH-2.5 mM de Ca²⁺) en ACM de ratas *sham* e isquémicas. Cada punto representa la media±e.s.m. de 6-8 animales. *p<0.05; **p<0.01 ipsilateral o contralateral vs *sham* mediante ANOVA de dos vías (presión y tratamiento) con medidas repetidas en el factor presión

5. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LA ESTRUCTURA Y LA DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS ARTERIAS CEREBRALES

Las medidas morfométricas de la ACM de ratas *sham* e isquémicas, tanto del lado ipsilateral como del lado contralateral, se resumen en la Tabla 1. El volumen de la pared y de la adventicia, así como el número total de células adventicias aumentó en las arterias ipsilaterales y contralaterales tras el período de isquemia-reperfusión, siendo este aumento superior en las arterias ipsilaterales que en las contralaterales. En cambio, la relación pared:luz aumentó en arterias ipsilaterales sin que se modificara de forma significativa en las arterias contralaterales. El período de isquemia-reperfusión no modificó el volumen de la media, el área de la superficie luminal, el número de CMLs y el número de células endoteliales.

Cuando se analizó la longitud y el grosor de los núcleos de las CMLs, los resultados obtenidos fueron similares en los tres grupos de vasos analizados. Por tanto, la isquemia-reperfusión no modificó el área de los núcleos de las CMLs (Figuras 20 y 21).

	Sham	Ipsilateral	Contralateral
Volumen de la pared (mm ³)	0.018±0.002	0.038±0.002***	0.027±0.002* ++
Volumen de la adventicia (mm ³)	0.008±0.001	0.026±0.002***	0.017±0.003* +
Volumen de la media (mm ³)	0.007±0.001	0.007±0.001	0.007±0.001
ASL (mm ²)	0.68±0.03	0.75±0.05	0.72±0.05
Pared:Luz (%)	11.36±1.44	18.78±1.86*	14.98±2.05
Número total de células adventicias	2020±305	7188±1140**	4273±737* +
Número total de células musculares lisas	6287±423	7060±979	6485±383
Número total de células endoteliales	1502±255	1700±166	1852±174

Tabla 1. Datos de la estructura correspondiente al análisis de las imágenes obtenidas por microscopía confocal de ACM presurizadas de ratas *sham* e isquémicas. Los valores representan la media±e.s.m. de 5-8 animales. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs *sham*, +p<0.05; ++p<0.01 vs ipsilateral mediante *t* de Student de datos no pareados. ASL, área de la superficie luminal.

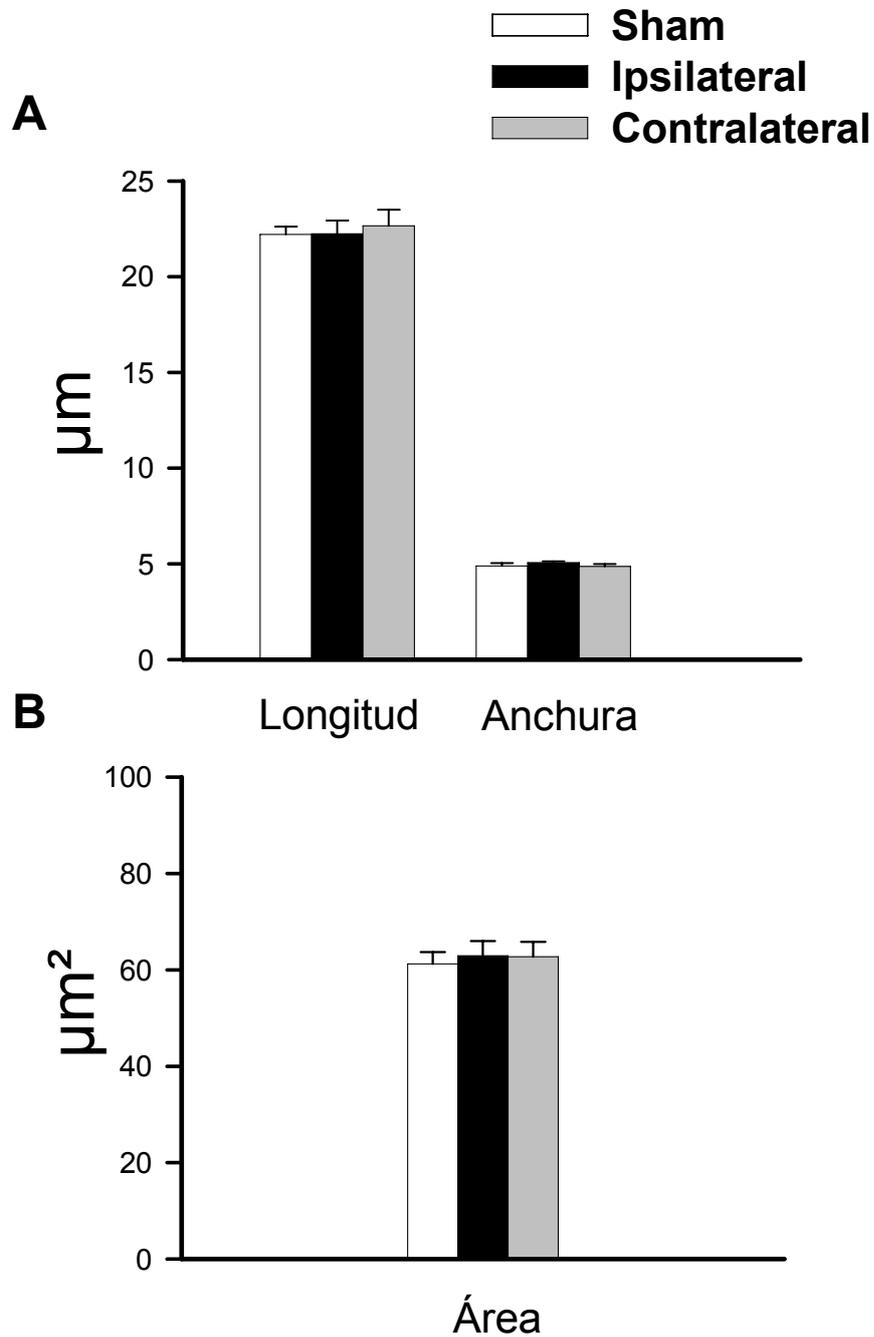


Figura 20. Comparación de la longitud y la anchura (A) y el área (B) de los núcleos de CMLs obtenidos de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas. Los resultados representan la media \pm e.s.m de 5-8 animales.

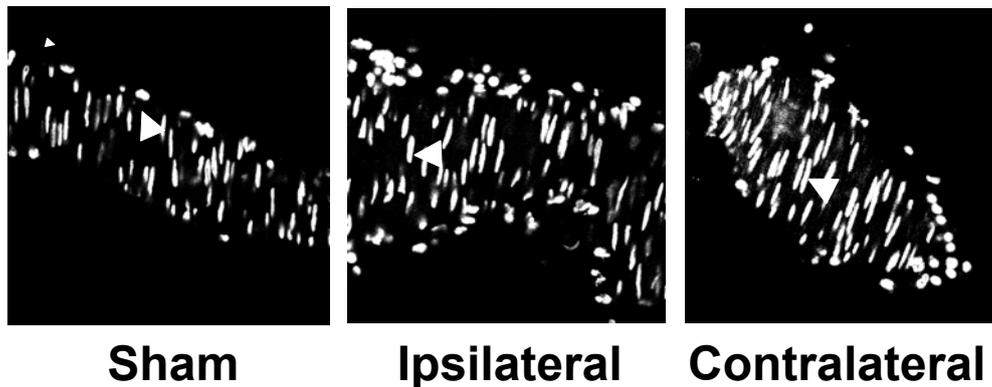


Figura 21. Imágenes representativas de núcleos de CMLs de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas. Las arterias fueron incubadas con Hoechst 33342 (10 μ M). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio láser confocal (objetivo 63X; zoom 1X). Las puntas de las flechas señalan núcleos representativos. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m.

Los núcleos de las células endoteliales de las ACMs de ratas *sham* e isquémicas (ipsilateral y contralateral) presentaron igual longitud y grosor. En consecuencia, el área de los núcleos no varió entre los distintos grupos experimentales estudiados (Figuras 22 y 23).

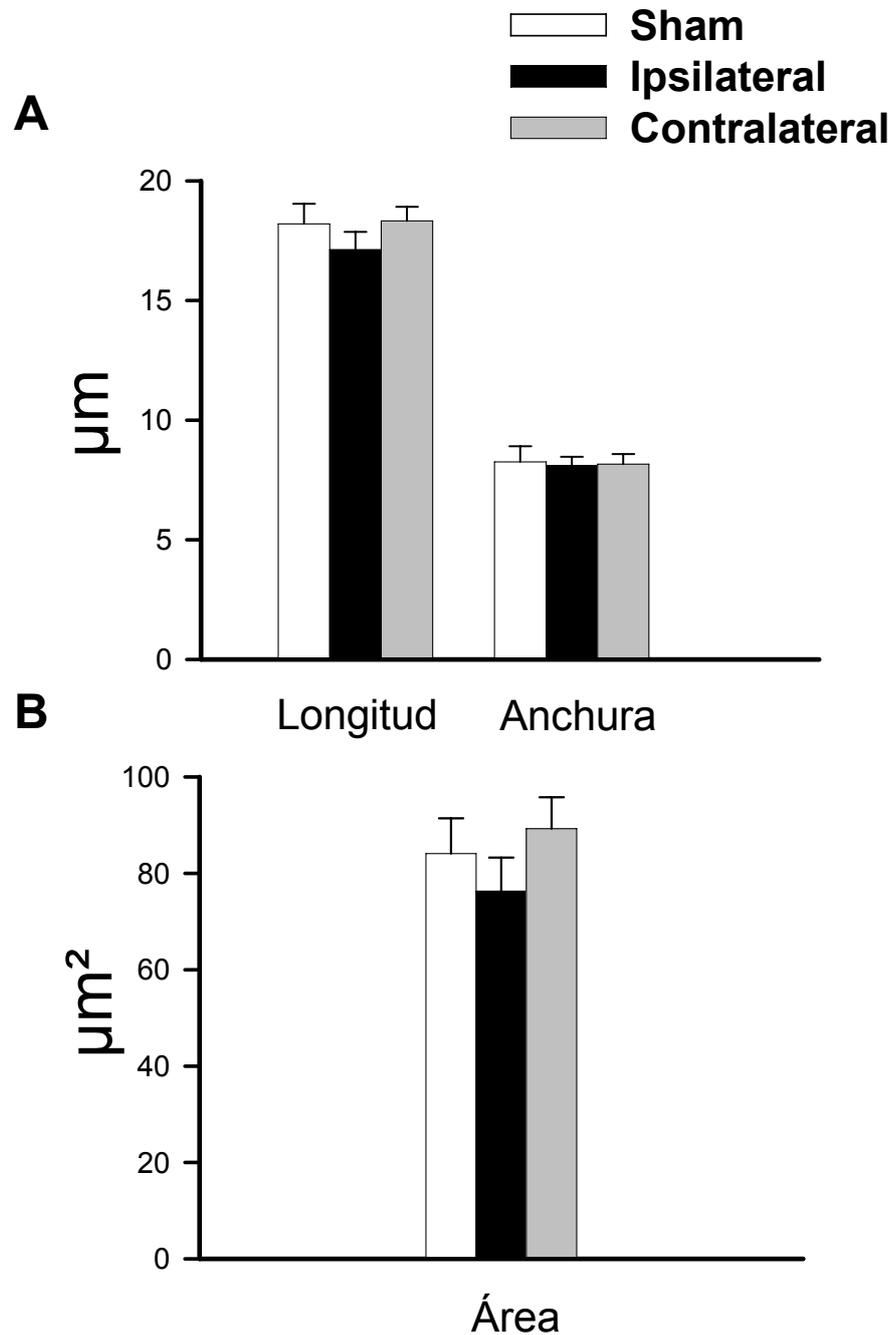


Figura 22. Comparación de la longitud y la anchura (A) y el área (B) de los núcleos de células endoteliales obtenidos de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas. Los resultados representan la media \pm e.s.m de 5-8 animales.

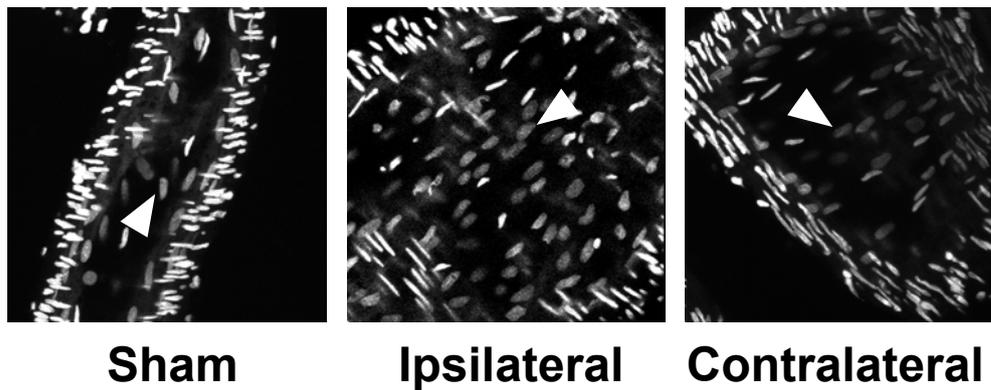


Figura 23. Imágenes representativas de núcleos de células endoteliales de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas. Las arterias fueron incubadas con Hoechst 33342 (10 μ M). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio láser confocal (objetivo 63X; zoom 1X). Las puntas de las flechas señalan núcleos representativos. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m.

6. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LA CANTIDAD DE COLÁGENO Y LA ORGANIZACIÓN DE ELASTINA

La Figura 24A muestra la distribución de colágeno en la pared de la ACM de ratas *sham* e isquémicas. La isquemia-reperfusión no modificó significativamente la cantidad de colágeno en las ACMs (Figura 24B).

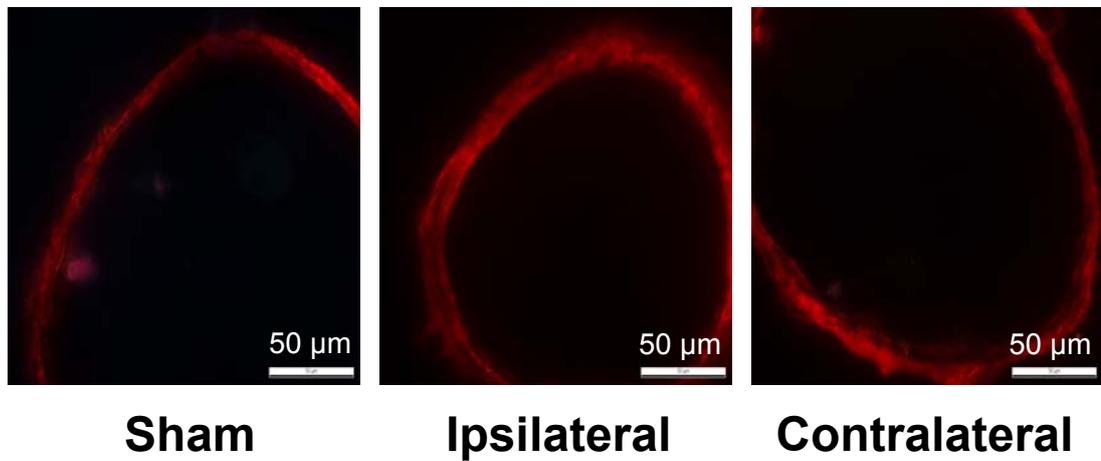
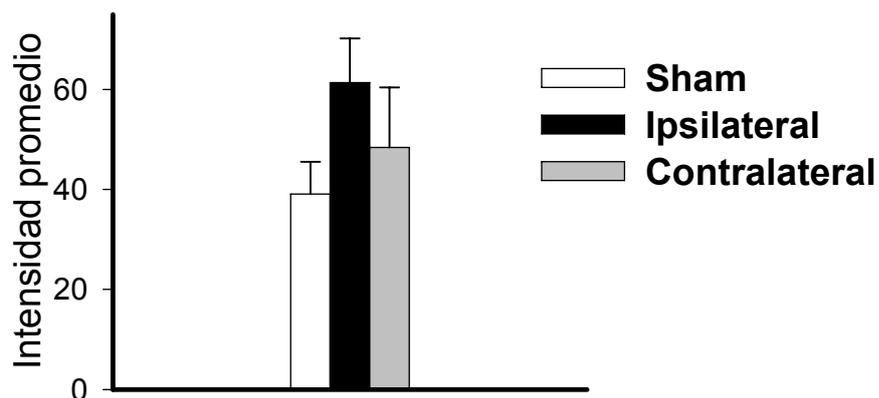
A**B**

Figura 24. Imágenes representativas de luz polarizada (A) y cuantificación (B) de colágeno en secciones transversales de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas teñidas mediante rojo sirio. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de luz polarizada circular (objetivo 40X). Los resultados representan la media ± e.s.m de 5 animales.

Como se muestra en la Figura 25, la elastina en la ACM se encuentra localizada fundamentalmente, en la LEI. Para analizar más detalladamente posibles cambios en la cantidad o estructura de elastina, se analizaron las imágenes de la misma obtenidas con el microscopio confocal. Con esta metodología se observó la presencia de fibras aisladas de elastina en la parte externa del vaso (datos no mostrados) así como la existencia de una lámina compacta fenestrada de elastina entra la capa media y la íntima (LEI; Figura 26). La Tabla 2 muestra las características de la elastina de la LEI en los tres grupos de arterias estudiados.

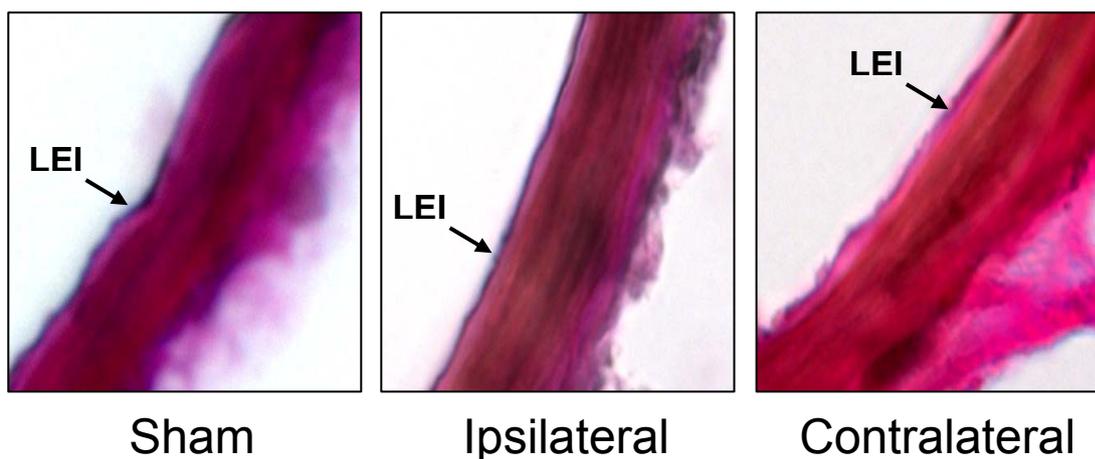


Figura 25. Imágenes representativas de secciones transversales de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas teñidas mediante la técnica de Verhoff Van Gieson. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio óptico (objetivo 100X). Dimensiones de la imagen 23 x 23 μm . LEI, lámina elástica interna.

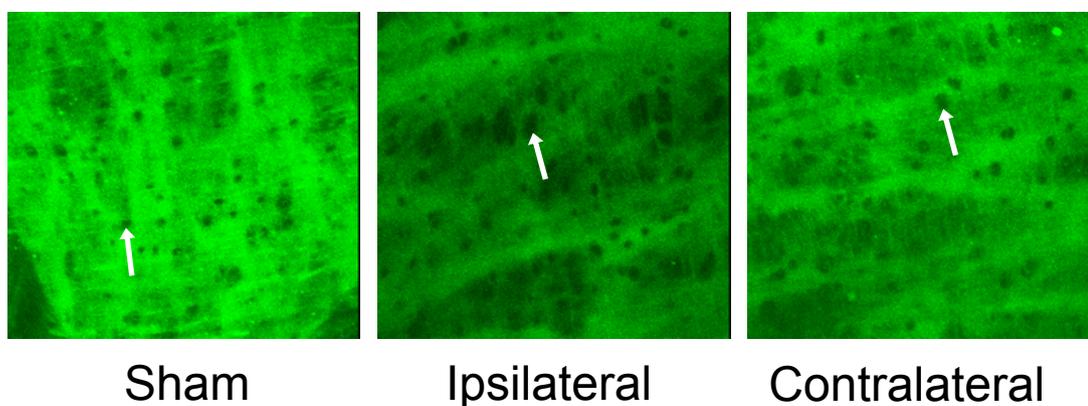


Figura 26. Imágenes representativas de la proyección media tridimensional de la LEI de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio láser confocal (objetivo: 63X; zoom: 3X). Las flechas señalan fenestras representativas. Dimensiones de la imagen 79 x 79 μm .

La isquemia-reperfusión aumentó significativamente el tamaño de las fenestras de la LEI en ACM de ratas isquémicas comparadas con las de ratas *sham*. Sin embargo, el número total de fenestras fue similar en las arterias de las ratas isquémicas comparadas con las arterias de las ratas *sham*. Además, tanto la intensidad media de fluorescencia por píxel como la fluorescencia total, fueron similares entre las arterias de ambos grupos de ratas, indicando que la cantidad total de elastina por mm de longitud de arteria no varía.

	Sham	Ipsilateral	Contralateral
Grosor de la LEI (μm)	4.7 \pm 0.2	4.8 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2
Número total de fenestras en la LEI	6884 \pm 594	9122 \pm 1288	7323 \pm 508
Área de la fenestra (μm^2)	6.9 \pm 0.9	15.0 \pm 1.3***	13.5 \pm 1.1**
Intensidad de fluorescencia/píxel	179.9 \pm 20.6	181.1 \pm 15.1	200.1 \pm 11.3
Fluorescencia total ($\times 10^6$) (intensidad por píxel por volumen)	6498 \pm 1255	6368 \pm 886	7562 \pm 850

Tabla 2. Características de la lámina elástica interna (LEI) de imágenes obtenidas por microscopía confocal de ACM presurizada de ratas *sham* e isquémicas. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs *sham* mediante *t* de Student de datos no pareados. Los valores representan la media \pm e.s.m de 5-7 animales.

7. EFECTO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

Secciones transversales de ACM de ratas *sham* mostraron una ligera fluorescencia en las tres tunicas vasculares. Sin embargo, en las ACMs procedentes de ratas isquémicas tanto del lado isquémico como del contralateral se observó un gran aumento de la fluorescencia en las capas íntima, media y adventicia, indicando mayor producción de O_2^- en la isquemia (Figura 27A). La especificidad de la sonda se confirmó al preincubar los anillos con el análogo permeable de la SOD, PEG-SOD (500 U/ml). Así, la presencia de PEG-SOD, disminuyó la fluorescencia observada en las tres situaciones experimentales estudiadas (Figura 27B).

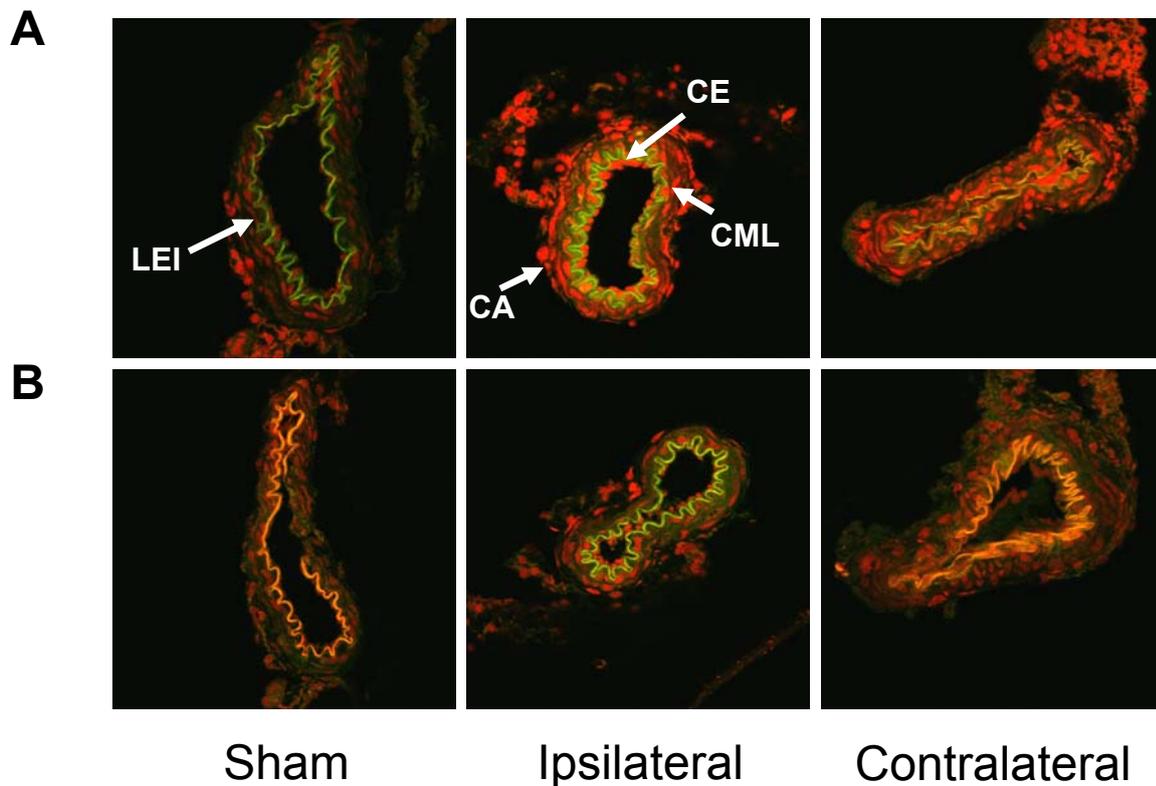


Figura 27. Imágenes representativas de secciones transversales de ACM de ratas *sham* e isquémicas teñidas con hidroetidina en ausencia (A) o en presencia (B) de PEG-SOD (500 U/ml). La tinción con hidroetidina produce fluorescencia cuando se oxida a bromuro de etidio por acción del $O_2^{\cdot-}$. CA, células adventicias; CE, células endoteliales; CML, células musculares lisas; LEI, lámina elástica interna. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m.

DISCUSIÓN

El tono arterial es controlado por la musculatura lisa que se contrae o relaja en respuesta a un aumento o a una disminución de la presión intramural. Generalmente se acepta que las arterias cerebrales mantienen un estado de vasoconstricción parcial o tono miogénico que facilita aumentos o disminuciones en el diámetro arterial participando en la modulación del flujo cerebral (Osol y Halpern, 1985). El control del tono miogénico parece fundamental para mantener una resistencia vascular adecuada protegiendo a las arteriolas y a los capilares de los cambios en la presión de perfusión.

Un proceso isquémico es aquel en el que se produce una interrupción del flujo sanguíneo y por tanto, un cambio en la presión de perfusión de las arterias. Asimismo, cambios en el flujo provocan cambios en la estructura vascular (Mulvany, 2002b). Es por tanto lógico, que procesos de isquemia-reperfusión produzcan alteraciones en la función y/o estructura vasculares.

La ACM es la arteria más comúnmente implicada en un cuadro de isquemia cerebral (McAuley, 1995). La oclusión de la ACM produce isquemia del tejido neural que a la vez puede dar lugar a un gran infarto cerebral (Carmichael, 2005). Tras ese período de isquemia, la perfusión es necesaria para reanudar el funcionamiento normal del tejido cerebral. Después de un período de isquemia-reperfusión, se han descrito, entre otras,

alteraciones en la estructura, en la mecánica y en el tono miogénico de las ACMs (Cipolla y cols., 1997; Coulson y cols., 2002). Sin embargo, aunque existe cierta información acerca de los mecanismos responsables de la alteración del tono miogénico de las arterias cerebrales después de un proceso de isquemia-reperfusión, no se conocen los mecanismos implicados en los cambios en la mecánica y estructura vasculares de estas arterias.

La regulación de la resistencia cerebrovascular y del flujo cerebral depende principalmente del calibre de los vasos sanguíneos dado que el flujo sanguíneo está relacionado con la cuarta potencia del radio del vaso (Paulson y cols., 1990). En consecuencia, variaciones pequeñas en el diámetro interno pueden producir cambios importantes en la resistencia cerebrovascular, alterando el flujo cerebral local y global (Johansson, 1989; Faraci y cols., 1989).

En nuestro modelo experimental, la isquemia-reperfusión provocó un aumento en el diámetro externo pero no en el diámetro interno de los vasos ipsilaterales. Esta alteración estaba acompañada por un incremento del grosor de la pared, del AST y de la relación pared:luz indicando la existencia de remodelado hipertrófico compensado en las ACMs ipsilaterales de ratas isquémicas. Puesto que ninguno de los parámetros estructurales estudiados estaba modificado significativamente en las ACMs contralaterales de ratas sometidas a isquemia-reperfusión, los datos obtenidos demuestran que los

cambios observados son probablemente una consecuencia directa de la isquemia focal. De acuerdo con estos resultados, en un estudio previo, Cipolla y cols. (1997) demostraron que 2 h de oclusión seguida de 24 h de reperfusión, causaban un incremento en el grosor de la pared arterial en ACMs aisladas de ratas SD.

El remodelado hipertrófico de la pared arterial puede ser producido, al menos en parte, por un aumento en el número y/o en el tamaño de las CMLs (Intengan y Schiffrin, 2000). En el presente estudio, el número y el tamaño de las CMLs no fueron modificados por la isquemia-reperfusión. Sin embargo, el número células adventicias, al igual que el volumen ocupado por esta capa de células, fue mayor en las arterias procedentes de ratas isquémicas que en las arterias de ratas *sham*. Estos resultados indican que el aumento observado en el grosor de la pared de la ACM producido por la isquemia reperfusión, es debido a un proceso de hiperplasia de las células adventicias que provoca hipertrofia de esta capa. No obstante, el hecho de que las arterias contralaterales también muestren cierto grado de hipertrofia e hiperplasia, parecería indicar que en este proceso de remodelado participan alteraciones secundarias sistémicas consecuencia de la isquemia focal. En este sentido, en rata y ratón se han descrito aumentos en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 en microvasos cerebrales no sólo en la zona cerebral isquémica sino también, aunque en menor intensidad, en la

zona contralateral y en zonas tan alejadas del cerebro como el corazón y los pulmones (Justicia y cols., 2006).

Hasta hace pocos años, se ha considerado que la capa adventicia desempeñaba un papel meramente de soporte de la pared vascular. Sin embargo, este concepto ha cambiado recientemente y se ha sugerido que esta capa arterial posee un papel destacado en la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares (McGrath y cols., 2005; Stenmark y cols., 2006). En este sentido, se ha descrito un aumento de células adventicias en diversos lechos vasculares de animales hipertensos (Arribas y cols., 1997a; 1997b; Kantachuevesiri y cols., 2001; Herrmann y cols., 2005) así como en cultivos de fibroblastos humanos sometidos a hipoxia (Krick y cols., 2005). El hecho de que muchas enfermedades vasculares como la hipertensión o la isquemia cerebral estén asociadas a procesos inflamatorios, sugiere una relación entre los conceptos de enfermedad inflamatoria e hiperplasia celular. De hecho, se ha descrito en arterias pulmonares que en situaciones de hipoxia, se produce un aumento de citoquinas que a su vez, inducen proliferación de los fibroblastos vasculares (Stenmark y cols., 2000; 2005).

El endotelio es responsable *in vivo* de las dimensiones de la luz y forma parte de la estructura general de los vasos sanguíneos. Además, dado que las células endoteliales se encuentran en contacto directo con diversas sustancias circulantes como los mitógenos, parecería lógico que en

condiciones anormales fueran estas células las primeras en padecer cambios estructurales. Así, se ha demostrado que procesos como el envejecimiento están asociados a un engrosamiento de la túnica íntima o a cambios en el tamaño de las células endoteliales (Haudenschild y cols., 1981; Briones y Vila, datos no publicados). Sin embargo, en este trabajo, no se observaron cambios significativos ni en el número total ni en la morfología de los núcleos de las células endoteliales. No obstante, en algunas arterias de ratas isquémicas se observó la presencia de algunos núcleos de morfología anómala que podrían ser células endoteliales alteradas. Se necesitarían estudios adicionales para determinar la frecuencia en la aparición de estas alteraciones así como el origen de las mismas.

Las propiedades mecánicas de los vasos pueden también estar alteradas cuando dichos vasos están dañados. En consecuencia, estudiar las propiedades mecánicas de los vasos en las enfermedades cardiovasculares para determinar si son capaces de participar en el control del flujo sanguíneo local, podría ser importante cuando se consideran tratamientos terapéuticos para la isquemia cerebral como los trombolíticos (Cipolla y Osol, 1998). Estos cambios en la mecánica vascular pueden reflejarse en cambios en el tamaño de las arterias. Así, se ha sugerido que cambios en la MEC pueden contribuir a las alteraciones mecánicas que podrían reducir el diámetro arterial

afectando a la resistencia periférica en diversas patologías como la hipertensión (Intengan y Schiffrin, 2000).

Las propiedades mecánicas de los vasos están influidas, fundamentalmente, por el colágeno y la elastina, que son los componentes mayoritarios de la MEC de la pared vascular arterial (Shadwick, 1999; Kobs y Chesler, 2006). Se ha sugerido que cambios en estas proteínas podrían estar implicados en el remodelado hipertrófico de arterias de resistencia (Arribas y cols., 2006). Es por tanto posible, que cambios en estas proteínas puedan participar en las alteraciones de las propiedades mecánicas inducidas por la isquemia cerebral en los vasos ipsilaterales.

La relación estrés-tensión de los vasos no es lineal debido a la acción conjunta del colágeno y de la elastina. La parte inicial de la curva, que corresponde a presiones bajas, está determinada por la deformación de las fibras de elastina, que son muy extensibles. En cambio, la parte final de la curva está determinada por las fibras de elastina totalmente estiradas y por la contribución de las fibras de colágeno, más rígidas. Tanto el desplazamiento de la relación estrés-tensión hacia la derecha como la disminución del parámetro β (medida de la rigidez vascular independiente de la geometría del vaso), demostraron que los vasos ipsilaterales de ratas isquémicas eran menos rígidos que los de ratas control (*sham*). En ACM de rata sometida a un proceso de oclusión (2 h)-reperfusión (1-2 min), en los que se observó un

aumento en la distensibilidad en estas arterias (Cipolla y cols., 1997). Sin embargo, en el mismo estudio, cuando el período de reperfusión aumentó a 24 h, la distensibilidad fue similar comparado con arterias de ratas a las que no se les practicaba cirugía. Los resultados obtenidos en el presente trabajo junto con los obtenidos por Cipolla y cols (1997), parecen sugerir que la evolución de las características mecánicas podría variar dependiendo de la duración del período de oclusión y/o de reperfusión. Igualmente, elementos de la MEC, como el colágeno o la elastina, podrían remodelarse dependiendo de la duración de la oclusión y/o de la reperfusión. En el presente trabajo se ha analizado, por primera vez, la cantidad de colágeno y de elastina de ACM después de un período de isquemia-reperfusión y su posible relación con los cambios mecánicos observados en las ACMs. La cantidad de colágeno total y la cantidad de elastina de la LEI, no se alteraron significativamente por la isquemia-reperfusión, lo que excluye cambios en la cantidad de estas proteínas como responsables del incremento en la elasticidad. Sin embargo, la organización de los componentes de la MEC también es importante puesto que determina la elasticidad intrínseca de los vasos (González y cols, 2005). En AMR de ratas hipertensas, se ha descrito una correlación entre la disminución del tamaño de las fenestras de la LEI y la disminución de la elasticidad vascular (Briones y cols., 2003; González y cols., 2006). En el presente estudio, se observó que el tamaño de las fenestras de la LEI de las

ACM de arterias de ratas isquémicas fue mayor que el de las arterias de ratas *sham*. Este hallazgo estaría de acuerdo con el aumento observado en la elasticidad intrínseca de los vasos de ratas isquémicas. Este mecanismo compensatorio podría contribuir a mantener, de manera más eficiente, el flujo sanguíneo necesario para conseguir una disminución del daño neuronal debido a la isquemia-reperfusión (Dorrance y cols., 2005). El aumento del tamaño de las fenestras en las ratas isquémicas se produce, tanto en los vasos ipsilaterales como en los contralaterales. Este hecho, junto con la situación topográfica en la que se encuentra la LEI, próxima a la luz arterial, podría sugerir la presencia de factores vasoactivos producidos durante la perfusión y liberados a la circulación sistémica. En este sentido, la expresión de VCAM-1 aumentó en la zona contralateral y en corazón y pulmones de ratas isquémicas (Justicia y cols., 2006).

Los mecanismos responsables del aumento del tamaño de las fenestras de la LEI después de la isquemia-reperfusión no están claros. Se ha descrito un aumento en la cantidad de elastasa liberada por neutrófilos en plasma de pacientes después de un infarto cerebral agudo (Iwatsuki y cols., 1998). Esta elastasa presente en plasma podría degradar la elastina en diferentes regiones de la circulación explicando así, el aumento en el tamaño de las fenestras en ACM de ratas isquémicas. En este sentido, se ha descrito que la digestión de elastina con elastasa pancreática aumentó el tamaño de

las fenestras de la LEI de arterias mesentéricas de resistencia (González y cols., 2006).

En situaciones de isquemia, es un hecho conocido que cuando se restablece el flujo tras un período de oclusión, es decir durante la reperfusión, se produce un fenómeno denominado *hiperemia reactiva*, que consiste en un aumento transitorio del flujo que alcanza valores superiores a los “normales” (Levick, 2003). Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen indicar que en las arterias ipsilaterales de ratas isquémicas durante la reperfusión y posiblemente debido al fenómeno de hiperemia reactiva, podría producirse un aumento de la presión en la pared. Dado que también se ha observado un aumento en el grosor de la pared en vasos ipsilaterales de ratas isquémicas, podríamos hipotetizar que este incremento en el tamaño de la pared sería una adaptación geométrica para mantener el estrés dentro de unos límites normales protegiendo así la pared vascular del daño producido por el aumento de presión provocado por la reperfusión. En este sentido, Folkow y cols (1958) propusieron que un aumento en el estrés de la pared podría ser un estímulo para la hipertrofia vascular.

En situación fisiológica, la circulación cerebral se encuentra en un estado de vasoconstricción parcial o tono miogénico que contribuye a la resistencia cerebrovascular y que permite a la arteria adaptarse a cualquier cambio del entorno (Osol, 1995; Mellander, 1989). Además, la arteria es

capaz de responder a los cambios de presión y de estiramiento por un proceso llamado *reactividad miogénica* (Johansson, 1989). Existen situaciones en las que la reactividad miogénica y la capacidad de autoregulación pueden estar alteradas. Así, después de un período de oclusión seguido de reperusión se observan fallos en la autoregulación cerebral así como parálisis vasomotora, que podrían contribuir al daño tisular y a la formación de edema que se observa en los procesos de isquemia focal y que se atribuye a la reperusión (Iadecola, 1998).

En el presente estudio, se observó que la isquemia cerebral produce una disminución del tono miogénico en la ACM. Esta disminución en el tono miogénico podría tener una consecuencia funcional. Después del período de isquemia, la reperusión debería asegurar la correcta irrigación del tejido neuronal. Para satisfacer esta demanda, la arteria debería mantenerse en un estado en que la acción vasoconstrictora del tono miogénico no comprometiera la irrigación de los tejidos distales. Así, una disminución del mismo, constituiría un mecanismo compensatorio que favorecería la irrigación correcta del tejido cerebral. Este hecho podría explicar el menor volumen de infarto observado en ratas WKY comparado con el volumen que se produce en ratas espontáneamente hipertensas (Grabowski y cols., 1993; resultados personales no publicados), ya que en las ratas hipertensas el tono miogénico de la ACM no se altera (resultados personales no publicados). El hecho de

que la disminución del tono miogénico se produzca tanto en los vasos del lado ipsilateral como del lado contralateral, indicaría la participación de factores sistémicos secundarios a la isquemia focal. Se ha descrito que la isquemia focal produce aumentos importantes de NO y de O_2^- a nivel sistémico (Kumura y cols., 1996) que podrían reaccionar formando $ONOO^-$ (Fukayama y cols., 1998). En un estudio reciente se ha sugerido, que niveles elevados de $ONOO^-$ durante la isquemia-reperfusión pueden nitrosilar y despolimerizar la actina de la musculatura lisa vascular contribuyendo a la disminución del tono miogénico (Maneen y cols., 2006). En el presente estudio, aunque no hemos medido niveles de NO o de $ONOO^-$, la isquemia-reperfusión aumentó la producción de O_2^- en la ACM tanto del lado ipsilateral como en el contralateral. Es por tanto posible, que parte del O_2^- formado pueda reaccionar con NO y producir $ONOO^-$ contribuyendo a la disminución del tono miogénico observado en ambos lados de la ACM de ratas sometidas a isquemia-reperfusión.

Todos estos resultados indican que un período de oclusión (90 min) con posterior perfusión (24 h) produce en ACMs de ratas WKY: 1) remodelado hipertrófico compensado en las arterias del lado ipsilateral, debido, al menos en parte, a un incremento en el volumen de la adventicia por hiperplasia de las células adventicias; 2) disminución del estrés de la pared como consecuencia del aumento en el tamaño de la misma; 3)

aumento de la elasticidad intrínseca arterial causado por el incremento del área de las fenestras de la LEI; 4) disminución del tono miogénico probablemente asociado a un aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y 5) alteraciones, aunque de menor intensidad, en la estructura de las arterias contralaterales, lo que sugiere la existencia de mediadores que remodelan las arterias a nivel sistémico.

El aumento de la elasticidad intrínseca y la disminución del tono miogénico en ACM de ratas isquémicas serían factores que favorecerían el correcto restablecimiento del flujo vascular después de una situación de obstrucción de la circulación sanguínea cerebral. De esta manera se reducirían los efectos perniciosos que se suceden después de la aparición de un episodio de isquemia-reperfusión.

Capítulo II. EFECTO DE LA IL-1 β SOBRE LAS PROPIEDADES ESTRUCTURALES, MECÁNICAS Y FUNCIONALES DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA IL-1 β SOBRE LA GEOMETRÍA DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA

Se realizaron curvas de presión crecientes en AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca) y en arterias cultivadas durante 14 h en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β (IL-1 β ; Figura 28). El incremento de presión intraluminal aumentó de forma presión-dependiente tanto el diámetro externo (Figura 28A), como el diámetro interno (Figura 28B), sin que se observaran diferencias significativas entre los tres grupos de arterias. Asimismo, el grosor de la pared (Figura 29A) y la relación pared:luz (Figura 29C) fueron similares en las tres situaciones experimentales estudiadas. No obstante, el AST (Figura 29B) de las arterias cultivadas con IL-1 β mostró una tendencia, que no alcanzó niveles estadísticos de significación, a aumentar cuando se comparó con las arterias recién extraídas del lecho vascular y las cultivadas sin IL-1 β .

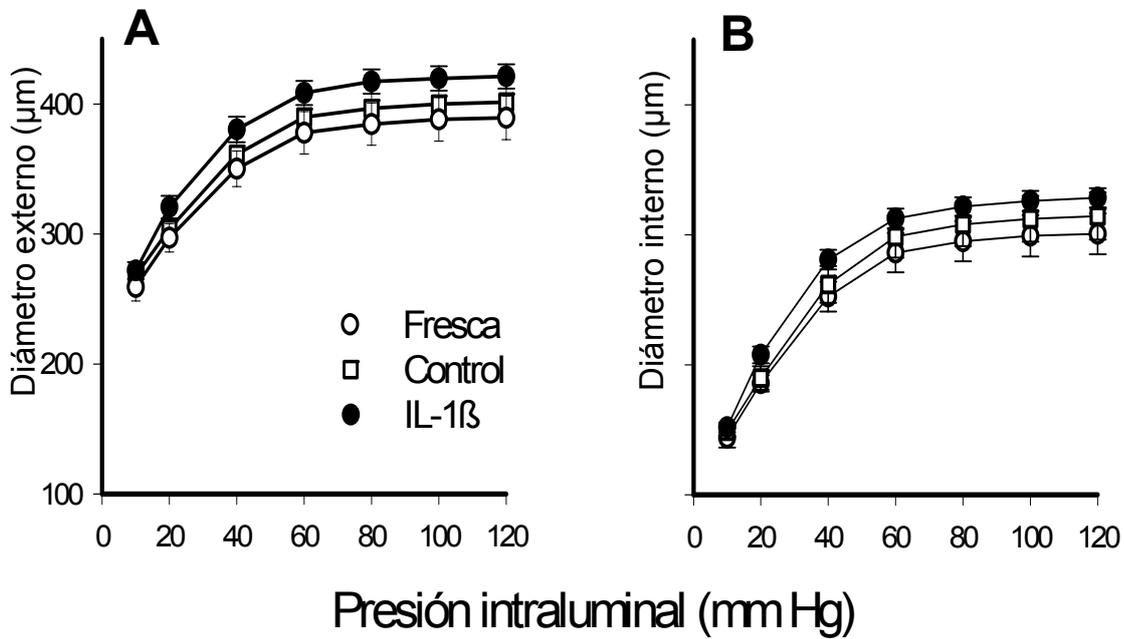


Figura 28. Efecto de la presión intraluminal sobre el diámetro externo (A) y el diámetro interno (B) en AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-8 animales.

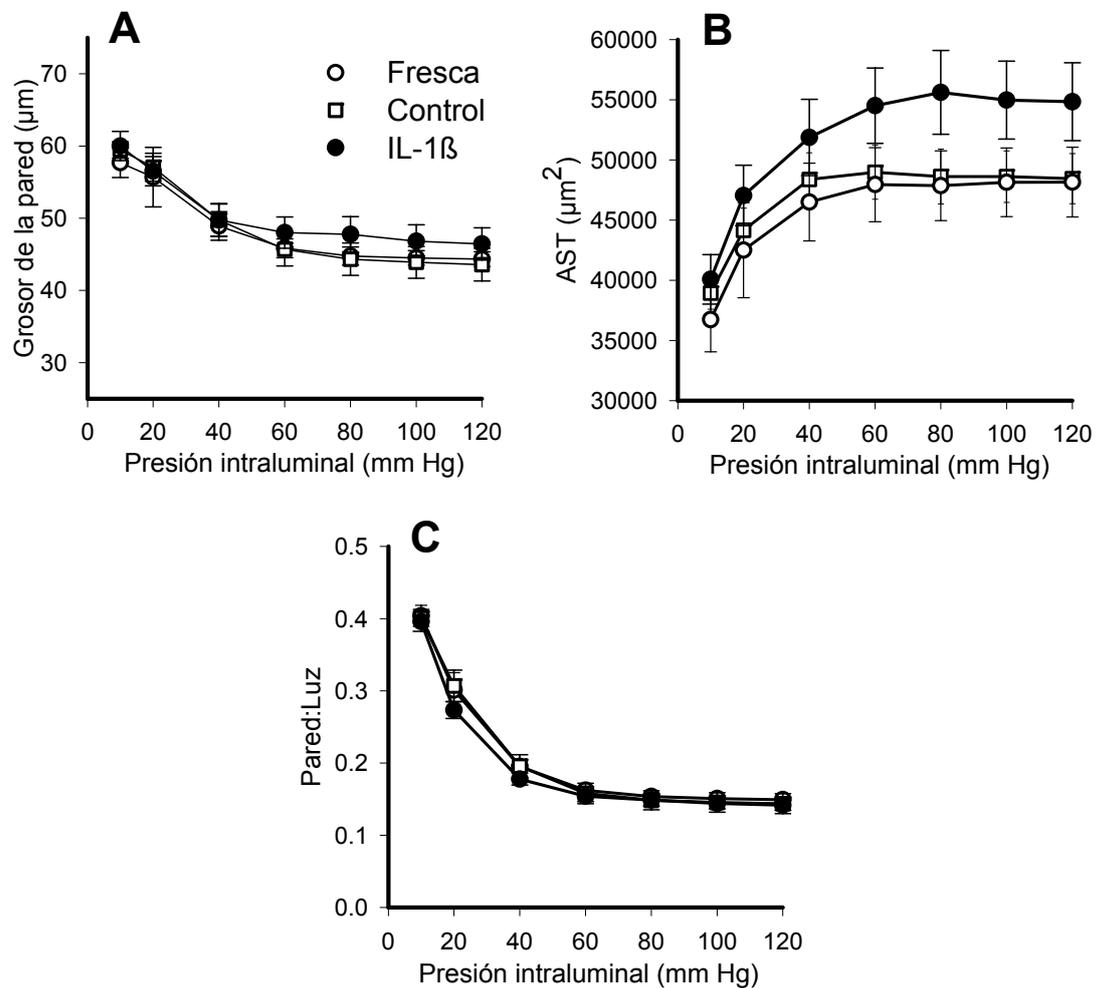


Figura 29. Efecto de la presión intraluminal sobre el grosor de la pared (A), el área de la sección transversal (AST; B) y la relación pared:luz (C), en AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-8 animales.

2. EFECTO DE LA IL-1 β SOBRE LA MECÁNICA DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA

El medio de cultivo, tanto en ausencia o en presencia de IL-1 β , no modificó la relación estrés-tensión (Figura 30A) ni el parámetro β (Fresca: 3.04 ± 0.11 ; Control: 3.10 ± 0.14 ; IL-1 β : 2.88 ± 0.10) cuando se comparó con las arterias recién extraídas del lecho vascular. Por otro lado, el estrés de la pared tampoco se modificó en ninguno de los tres grupos experimentales (Figura 30B).

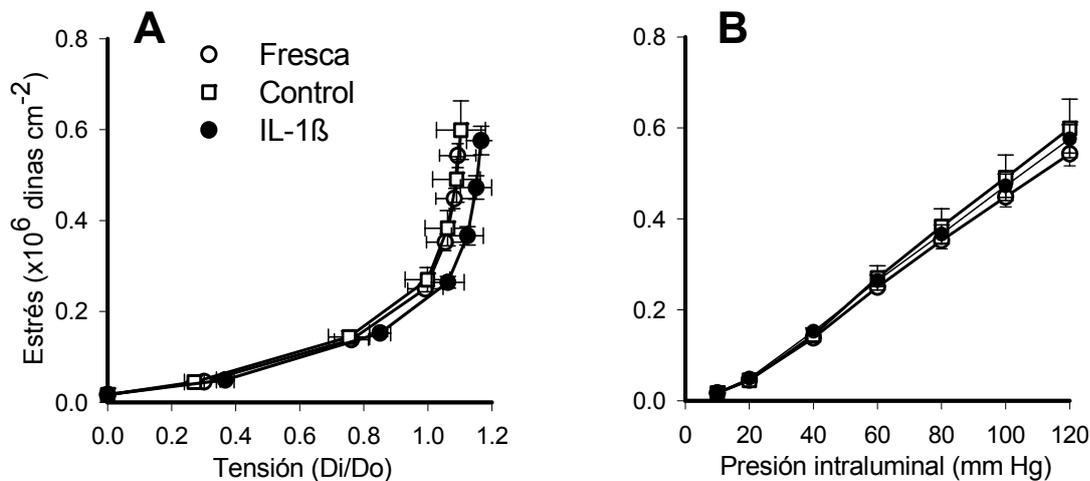


Figura 30. Relación estrés-tensión (A) y efecto de la presión intraluminal sobre el estrés de la pared (B) en AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-8 animales.

3. EFECTO DE LA IL-1 β SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA

3.1 Efecto de la IL-1 β sobre las relajaciones dependientes e independientes de endotelio

En AMRs precontraídas con FE (2 μ M), la ACh (1 nM-10 μ M) relajó de manera concentración-dependiente en los tres grupos experimentales estudiados (Figura 31A). Tanto el medio de cultivo *per se* como la presencia de IL-1 β (10 ng/ml; 14 h) disminuyeron significativamente la relajación inducida por ACh. La disminución de la relajación fue superior en las arterias incubadas en presencia que en ausencia de IL-1 β .

Para comprobar si la disminución en la relajación a ACh producida por la IL-1 β era común a fármacos que actúan a través de la liberación de NO e independientemente de la presencia de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta al donador exógeno de NO, NPS (1 nM-1 mM). Al igual que se observó con la relajación a ACh, el medio de cultivo empeoró la relajación a NPS, siendo éste empeoramiento mayor en las arterias incubadas en presencia de IL-1 β (Figura 31B).

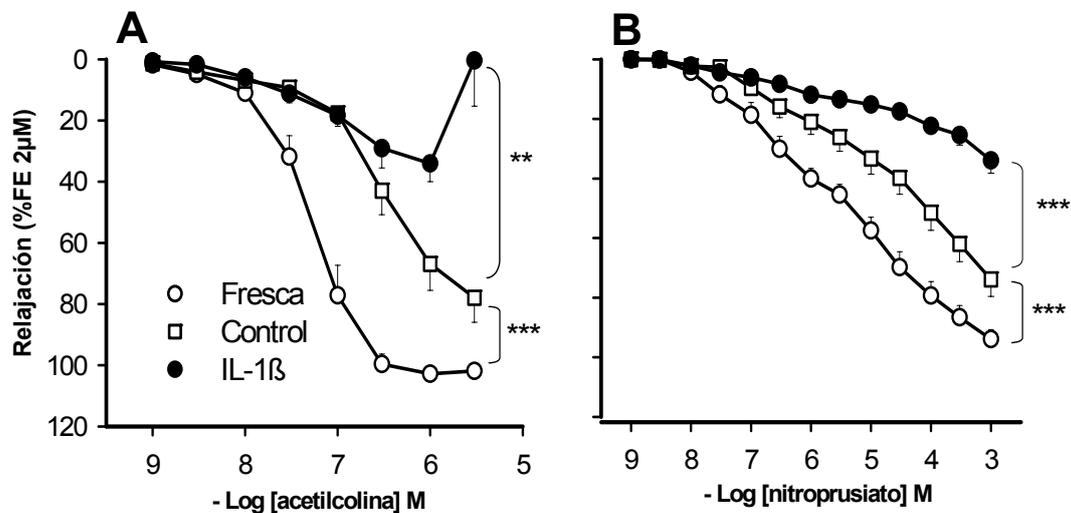


Figura 31. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (A) y a nitroprusiato sódico (B) en AMRs precontraídas con fenilefrina (FE) recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 8-13 animales. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

Para analizar si el empeoramiento de la relajación a ACh producido por la IL-1 β estaba relacionado con una disminución en la biodisponibilidad de NO, se realizaron curvas concentración-respuesta a ACh en presencia de L-NAME (100 μ M), inhibidor no selectivo de la NOS. La incubación con IL-1 β disminuyó la relajación a ACh de manera similar en ausencia o en presencia de L-NAME. Sin embargo, L-NAME abolió la respuesta relajadora a ACh en arterias controles (Figura 32).

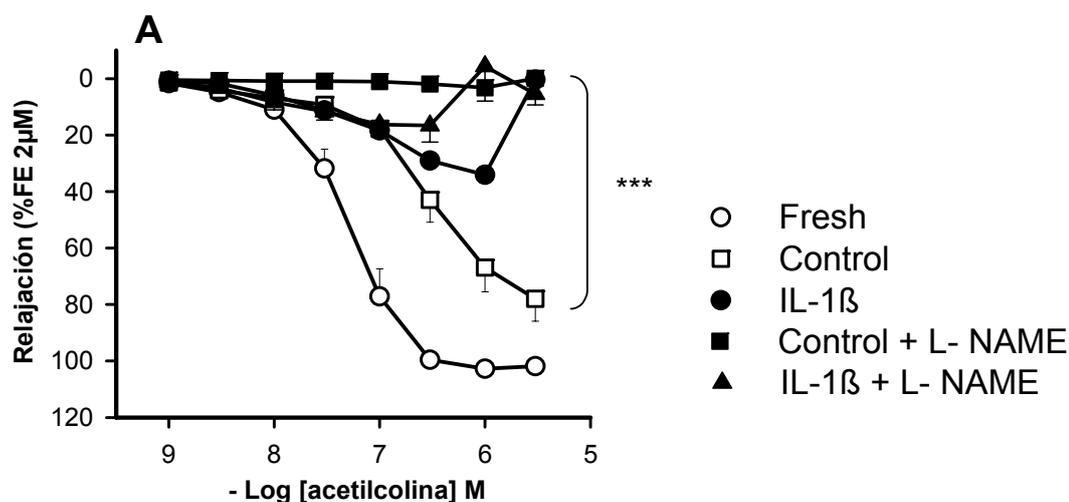


Figura 32. Influencia del L-NAME (100 μ M) sobre las curvas concentración-respuesta a acetilcolina en AMRs de rata precontraídas con fenilefrina (FE) recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-13 animales. *** $p < 0.001$ mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

Para comprobar si la alteración de las respuestas relajantes era un defecto generalizado sobre fármacos vasodilatadores inducido por IL-1 β , se realizaron curvas concentración-respuesta a papaverina (0.1 μ M-0.1 mM), un fármaco relajante de la musculatura lisa que actúa por inactivación de las fosfodiesterasas. La relajación producida por papaverina no se alteró por la incubación de las arterias con medio de cultivo en ausencia o en presencia de IL-1 β (Figura 33A).

Para analizar si el empeoramiento de la relajación a ACh y a NPS inducido por IL-1 β era debido a una alteración en la respuesta del músculo liso a GMPc se realizaron curvas concentración-respuesta a 8-BrGMPc (10 nM-1 mM), análogo del GMPc permeable a la membrana celular, en arterias precontraídas con FE. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la relajación a 8-BrGMPc entre las tres situaciones experimentales estudiadas (Figura 33B).

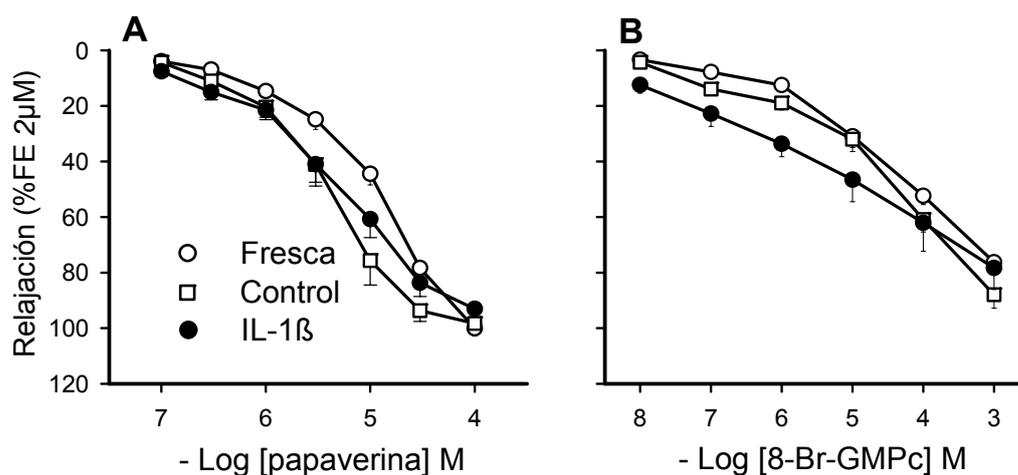


Figura 33. Curvas concentración-respuesta a papaverina (A) y a 8-bromoguanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (8-Br-GMPc; B) en AMRs precontraídas con fenilefrina (FE) recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 7-8 animales.

3.2 Efecto de la IL-1 β sobre la expresión de eNOS y de GCs

Para evaluar si posibles cambios en la expresión de eNOS o de GCs pudiesen estar implicados en el empeoramiento de la relajación a ACh y a NPS producido por IL-1 β , se evaluó la expresión de dichas enzimas en las tres situaciones experimentales. Las señales de eNOS y de GCs fueron observadas como una sola banda a 140 y 70 KDa, respectivamente. El análisis de los datos obtenidos por “Western Blot” mostró que la expresión de la eNOS y de la GCs fue similar entre las arterias recién extraídas del lecho vascular y las arterias cultivadas con o sin IL-1 β (Figura 34).

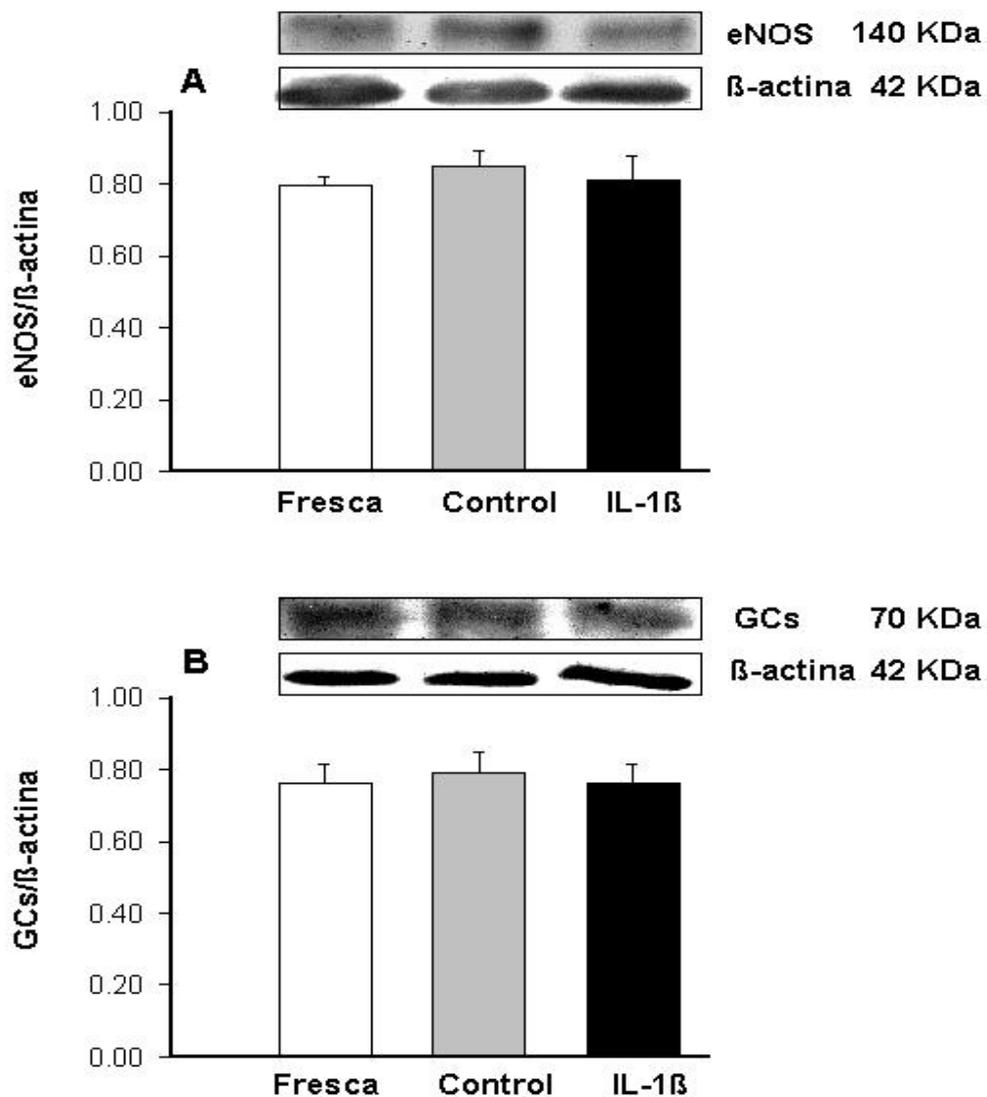


Figura 34. Blot representativo y análisis densitométrico de la expresión de eNOS (A) y de GCs (B) en AMRs recién extraídas del lecho vascular (Frescas) y mantenidas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . También se muestra la expresión de β -actina como control de carga. Los resultados representan la media \pm e.s.m de 5-7 animales.

3.3 Efecto de la IL-1 β sobre la producción de nitritos y sobre la expresión de iNOS

La incubación de las arterias en medio de cultivo durante 14 h provocó una ligera producción de nitritos que fue incrementada significativamente en presencia de IL-1 β (Figura 35A). No se observó expresión de iNOS en arterias recién extraídas del lecho vascular o en arterias incubadas en medio de cultivo. Sin embargo, la incubación de las arterias con IL-1 β produjo un aumento de la expresión de esta enzima (Figura 35B). Estos resultados se confirmaron mediante estudios de inmunofluorescencia en los que se observó que sólo las arterias incubadas en presencia de IL-1 β expresaron iNOS, que se encontraba localizada en las células endoteliales y en las CMLs (Figura 36).

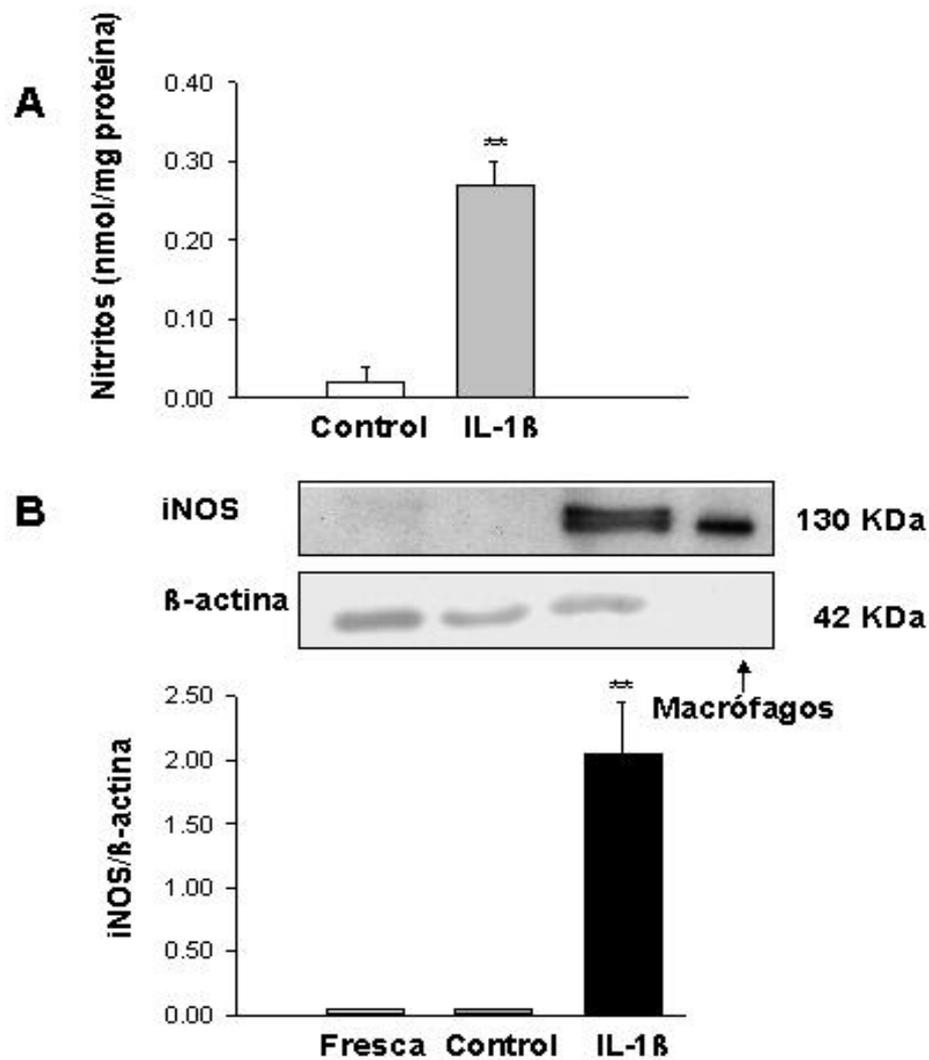


Figura 35. Niveles de nitritos (A) medidos en medio de cultivo de AMRs incubadas (14 h) en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Blot representativo y análisis densitométrico (B) de la expresión de iNOS en AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . También se muestra la expresión de β -actina como control de carga. Los resultados representan la media \pm e.s.m de 6 animales. **p<0.01 vs control mediante ANOVA de una vía.

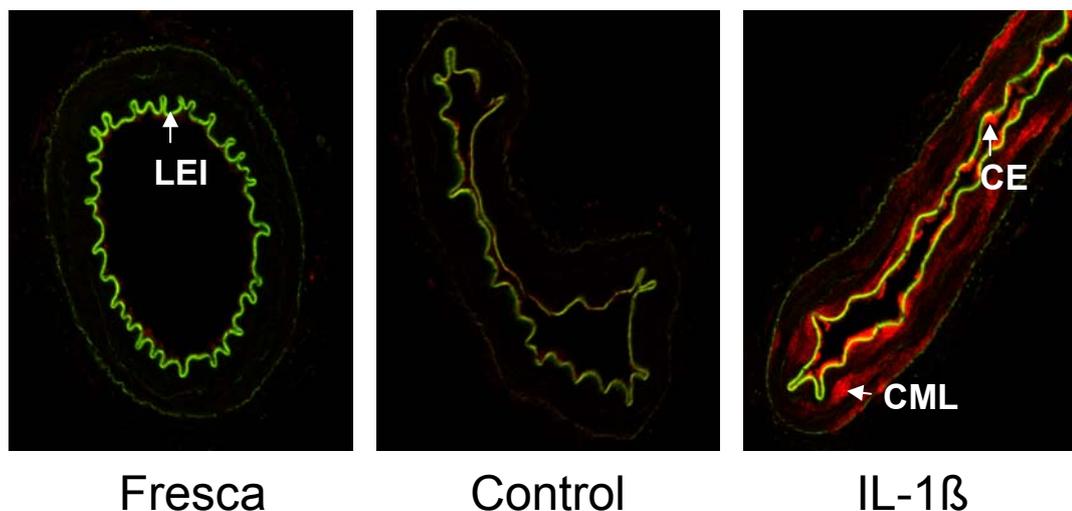


Figura 36. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de iNOS en secciones transversales de AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . LEI, lámina elástica interna; CE, células endoteliales; CML, células musculares lisas. Dimensiones de la imagen 238 x 238 μ m.

3.3.1 Papel de iNOS en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β

Para analizar si la iNOS participa en el empeoramiento de la relajación a ACh y a NPS observado en las arterias mantenidas en medio de cultivo en ausencia o en presencia de IL-1 β , los vasos fueron incubados con 1400W (1 μ M), inhibidor selectivo de la iNOS. La presencia de 1400W no mejoró el empeoramiento de las respuestas a ACh provocado por la IL-1 β (Figura 37A). Sin embargo, el 1400W mejoró el empeoramiento de las respuestas a NPS producido por IL-1 β (Figura 37B). Por otro lado, las

respuestas a ACh y a NPS de las arterias incubadas en medio de cultivo en ausencia de IL-1 β no se modificaron por 1400W (Figura 37).

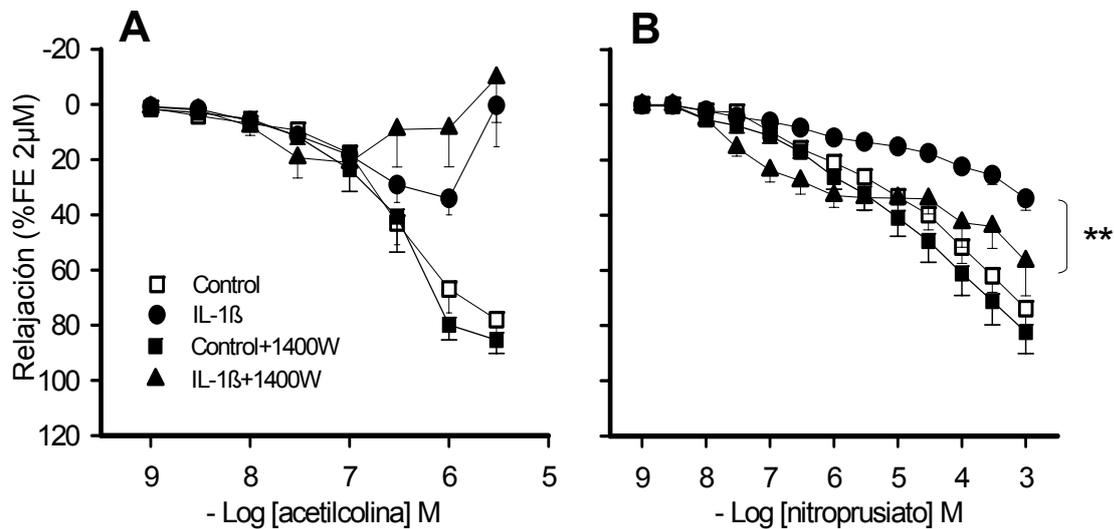


Figura 37. Efecto de 1400W (1 μ M) sobre las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (A) y a nitroprusiato sódico (B) en AMRs de rata precontraídas con fenilefrina (FE) incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6 animales. ** $p < 0.01$ mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

3.4 Efecto de IL-1 β sobre la producción de anión superóxido y sobre la expresión de xantina oxidasa y de p22^{phox}

Dado que el empeoramiento de la relajación inducido por el medio de cultivo, tanto en ausencia como en presencia de IL-1 β , era específico de fármacos que actúan a través de la liberación de NO, estudiamos si un

aumento en el estrés oxidativo y más concretamente, en la producción de $O_2^{\cdot-}$, podría ser el responsable de dicho empeoramiento por disminución en la biodisponibilidad de NO. En primer lugar, evaluamos la producción *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ mediante el uso de la sonda fluorescente HE. Como se muestra en la Figura 38, secciones transversales de arterias recién extraídas del lecho vascular no mostraron fluorescencia en ninguna de las 3 capas vasculares. Sin embargo, en arterias incubadas en medio de cultivo en ausencia de IL-1 β , se observó un ligero aumento de la fluorescencia que fue potenciado significativamente cuando las arterias se incubaron con IL-1 β (Figura 38). El incremento en la fluorescencia se localizó en la capa íntima, en la media y en la adventicia. La especificidad de la sonda se confirmó al preincubar los anillos con el análogo permeable de la SOD, PEG-SOD (500 U/ml). La presencia de PEG-SOD, disminuyó la fluorescencia inducida por HE en arterias mantenidas en medio de cultivo tanto en ausencia como en presencia de IL-1 β (Figura 38).

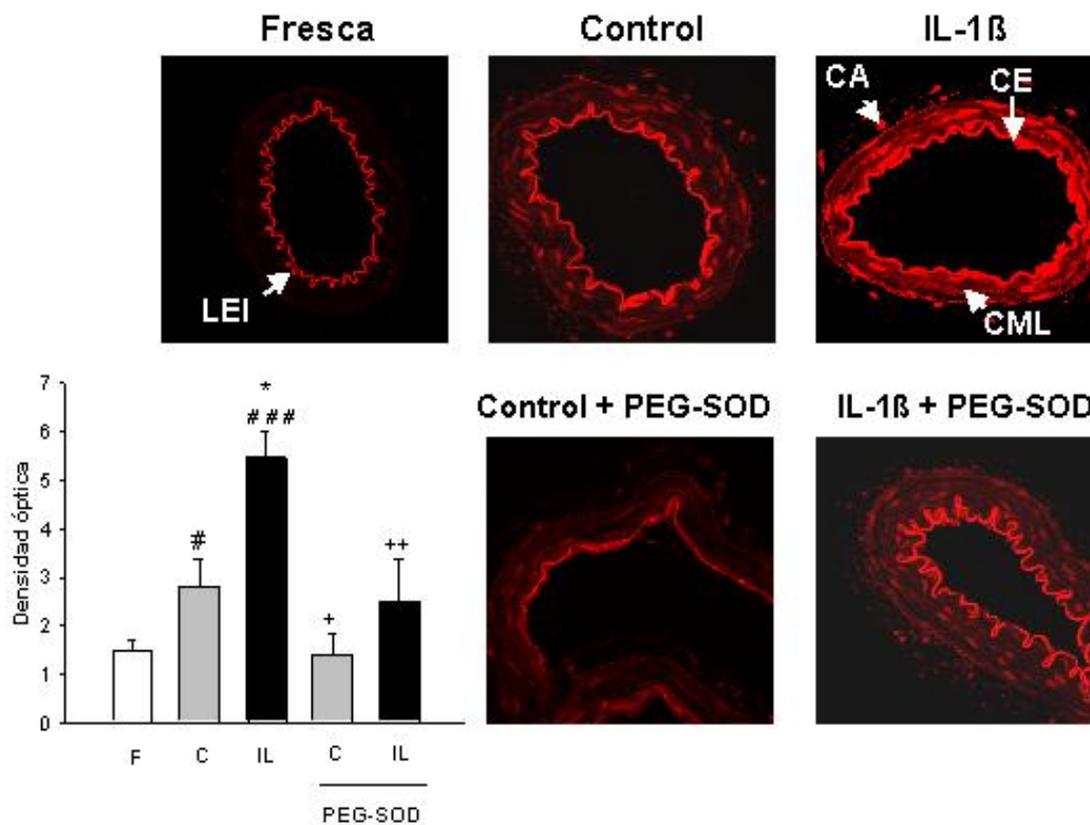


Figura 38. Imágenes representativas y cuantificación de las secciones transversales de AMRs recién extraídas del lecho vascular (Fresca, F) e incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control, C) o en presencia de IL-1 β , en ausencia o en presencia de PEG-SOD (500 U/ml). Los vasos se tiñeron con hidroetidina que produce fluorescencia cuando se oxida a bromuro de etidio por acción del O₂⁻. Los resultados representan la media \pm e.s.m de 6 animales. CA, células adventicias; CE, células endoteliales; CML, células musculares lisas; LEI, lámina elástica interna. Dimensiones de la imagen 256 x 256 μ m. #p<0.05; ###p<0.001 vs Fresca; *p<0.05 vs Control; +p<0.05; ++p<0.01 vs vasos no incubados con PEG-SOD mediante ANOVA de una vía seguida del test de Tukey.

Debido a que IL-1 β aumentó significativamente la producción de O₂⁻, se realizaron experimentos encaminados a determinar el origen enzimático de este radical libre. Para ello, se analizó el efecto del inhibidor de la xantina oxidasa, alopurinol (1 mM; Figura 39) y del inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (0.3 mM; Figura 40), sobre la producción de O₂⁻ en secciones transversales de AMR. La incubación con alopurinol disminuyó significativamente la producción O₂⁻ inducida por IL-1 β (Figura 39). Sin embargo, apocinina sólo produjo una ligera disminución de la fluorescencia en arterias incubas con IL-1 β (Figura 40).

Puesto que la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa participaban, al menos en parte, en la formación de O₂⁻ producida por IL-1 β , en el siguiente grupo de experimentos se analizó si esta citoquina alteraba la expresión de dichas enzimas. IL-1 β aumentó la expresión de xantina oxidasa (Figura 41) y de la subunidad p22^{phox} de la NADPH oxidasa (Figura 42) en AMR. Dicho aumento se localizó preferentemente en la capa media (Figuras 41 y 42).

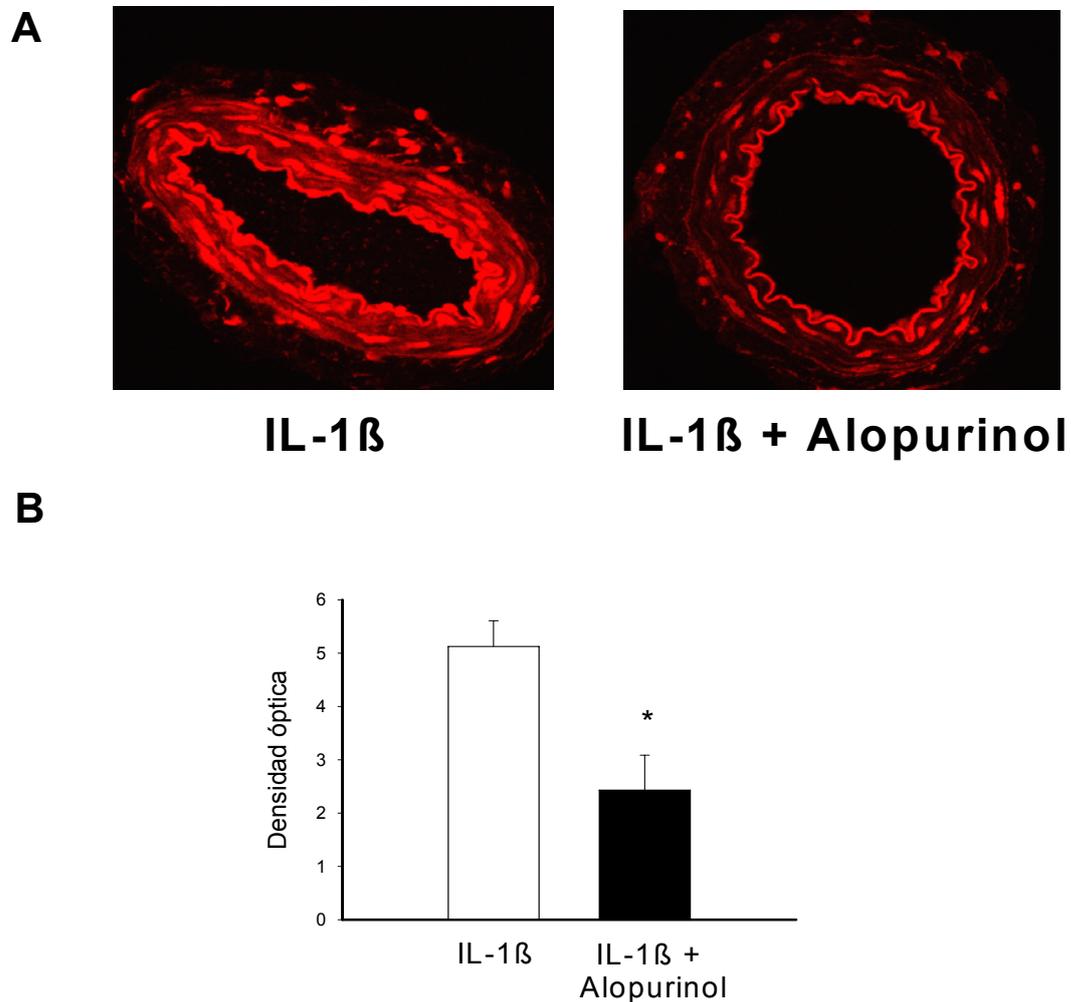


Figura 39. Imágenes representativas (A) y cuantificación (B) de secciones transversales de AMRs incubadas (14 h) en medio de cultivo con IL-1 β en ausencia o en presencia de alopurinol (1 mM). Los vasos se tiñeron con hidroetidina que produce fluorescencia cuando se oxida a bromuro de etidio por acción del O₂⁻. Los resultados representan la media±e.s.m de 5 animales. Dimensiones de la imagen 256 x 256 μ m. *p<0.05 vs IL-1 β mediante *t* de Student de datos pareados.

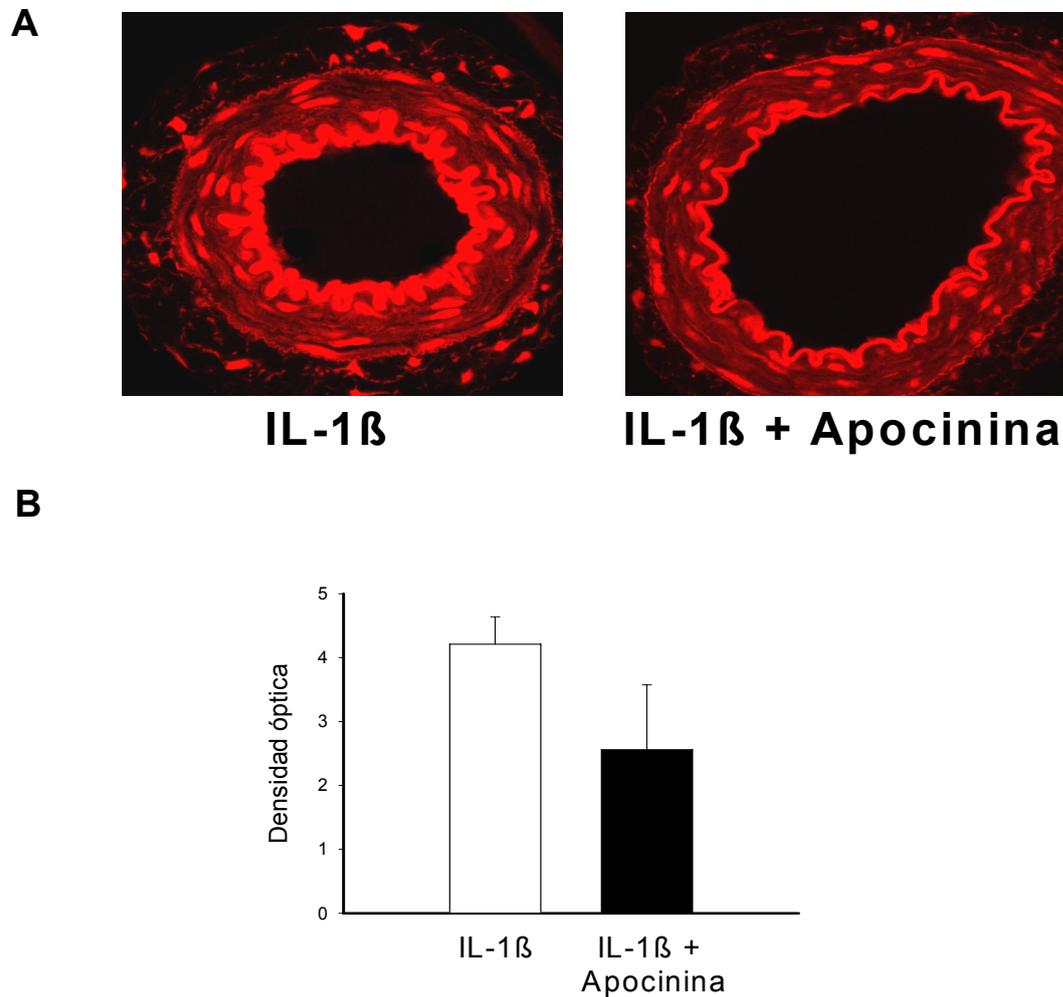


Figura 40. Imágenes representativas (A) y cuantificación (B) de secciones transversales de AMRs incubadas (14 h) en medio de cultivo con IL-1 β en ausencia o en presencia de apocinina (0.3 mM). Los vasos se tiñeron con hidroetidina que produce fluorescencia cuando se oxida a bromuro de etidio por acción del O₂^{•-}. Los resultados representan la media ± e.s.m de 5 animales. Dimensiones de la imagen 256 x 256 μ m.

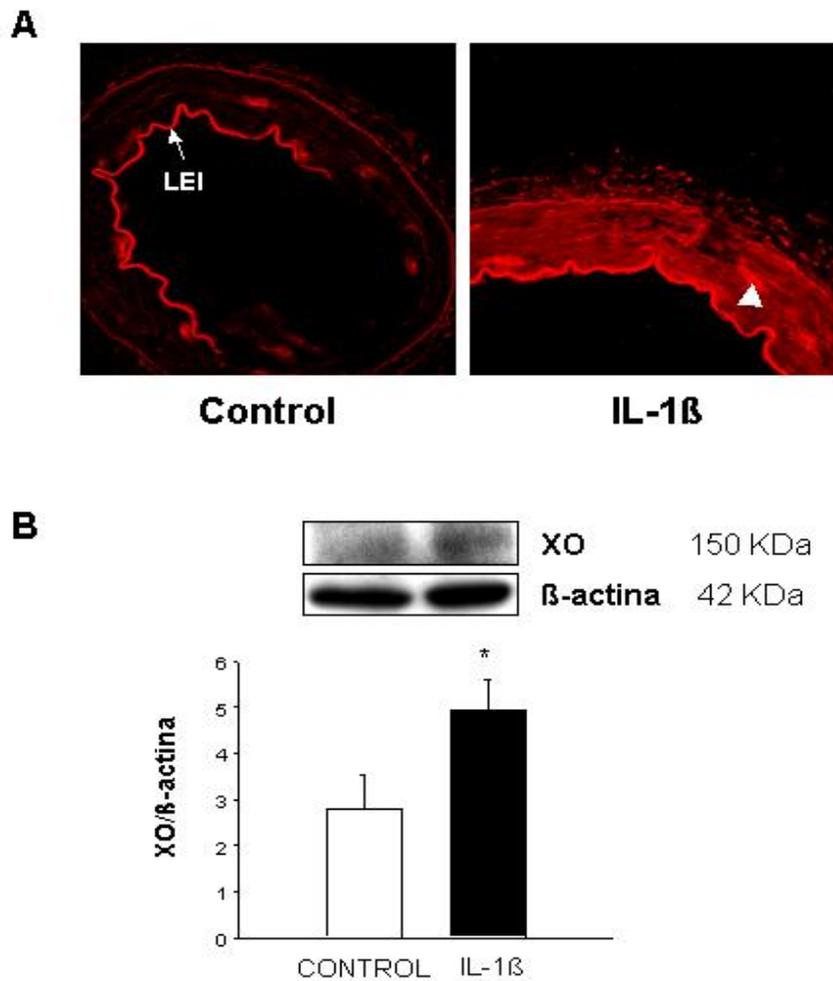


Figura 41. Imágenes representativas de inmunofluorescencia (A) y blot y análisis densitométrico (B) de la expresión de xantina oxidasa (XO) de AMRs incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . También se muestra la expresión de β -actina como control de carga. La punta de la flecha muestra el marcaje positivo. Los resultados representan la media \pm e.s.m de 3-4 animales. LEI, lámina elástica interna. Dimensiones de la imagen 256 x 256 μ m. * p <0.05 mediante t de Student.

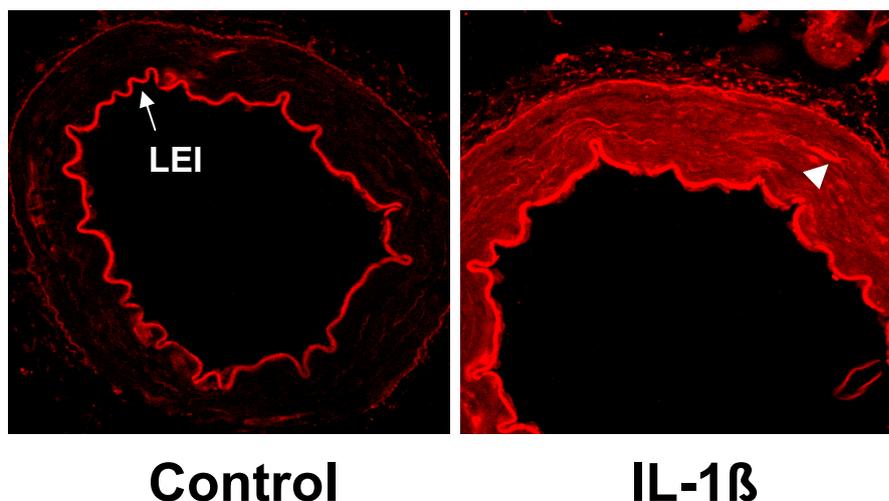


Figura 42. Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la expresión de p22^{phox} de secciones transversales de AMRs incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . La punta de la flecha muestra el marcaje positivo. LEI, lámina elástica interna. Dimensiones de la imagen 256 x 256 μ m

3.4.1 Papel de los aniones superóxido en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β

Para analizar si los O₂⁻ participan en el empeoramiento de la relajación a ACh observado en arterias mantenidas en medio de cultivo en ausencia o en presencia de IL-1 β , los vasos fueron incubados con SOD (150 U/ml) enzima detoxificador de O₂⁻. La presencia de SOD mejoró de manera parcial, la respuesta a ACh en arterias controles, sin modificar la respuesta a ACh en las arterias incubadas en presencia de IL-1 β (Figura 43).

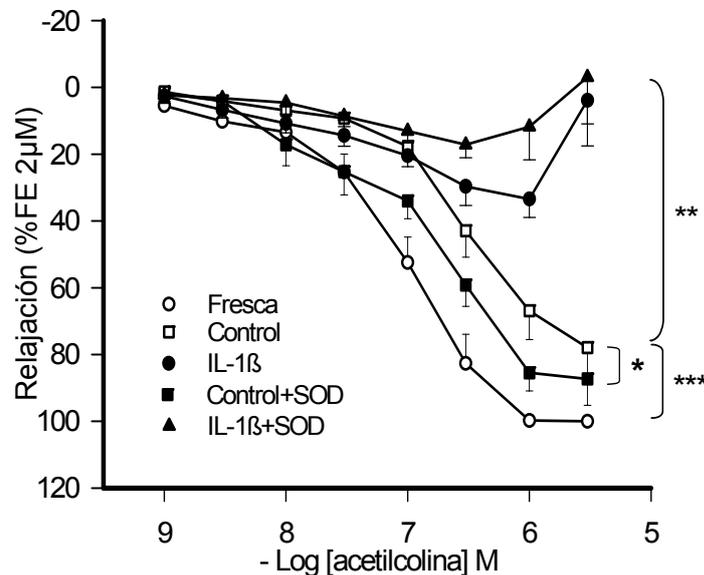


Figura 43. Efecto de SOD sobre las curvas concentración-respuesta a acetilcolina de AMRs precontraídas con fenilefrina (FE) recién extraídas del lecho vascular (Fresca) e incubadas en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-10 animales. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

Puesto que SOD no mejoró el empeoramiento de la relajación a ACh producido por IL-1 β en el siguiente grupo de experimentos se analizó el efecto de PEG-SOD, análogo permeable de SOD, que podría, por su mayor capacidad de penetración, inactivar el O₂⁻ a nivel intracelular. La presencia de PEG-SOD (200 U/ml) mejoró el empeoramiento de la relajación a ACh en las arterias incubadas tanto en ausencia como en presencia de IL-1 β (Figura

44). Sin embargo, en presencia de PEG-SOD las respuestas relajantes a ACh de arterias controles e incubadas con IL-1 β no alcanzaron los valores encontrados en las arterias recién extraídas del lecho vascular (Figura 44).

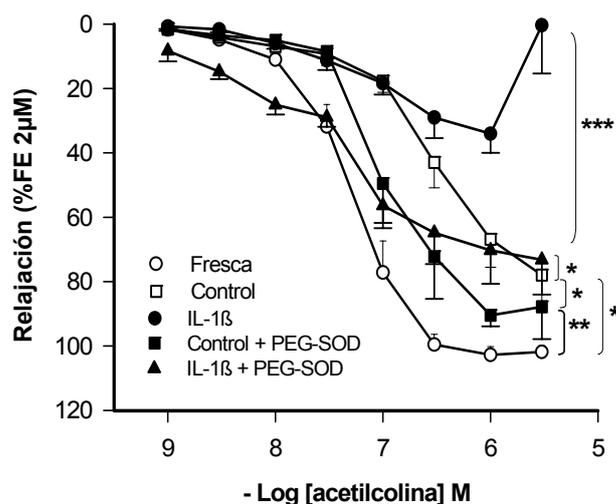


Figura 44. Efecto de PEG-SOD (200 U/ml) sobre las curvas concentración-respuesta a acetilcolina en AMRs precontraídas con fenilefrina (FE) incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . También se muestra la respuesta a acetilcolina en arterias recién extraídas del lecho vascular (Fresca). Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-11 animales. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

3.4.2 Papel de la xantina oxidasa en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β

Alopurinol (1 mM) mejoró el empeoramiento de la relajación a ACh y a NPS observado en arterias incubadas en ausencia y en presencia de IL-1 β (Figuras 45A y 45B). No obstante, en arterias tratadas con IL-1 β en presencia de alopurinol, las relajaciones a ACh y a NPS no alcanzaron los valores de relajación obtenidos en arterias control.

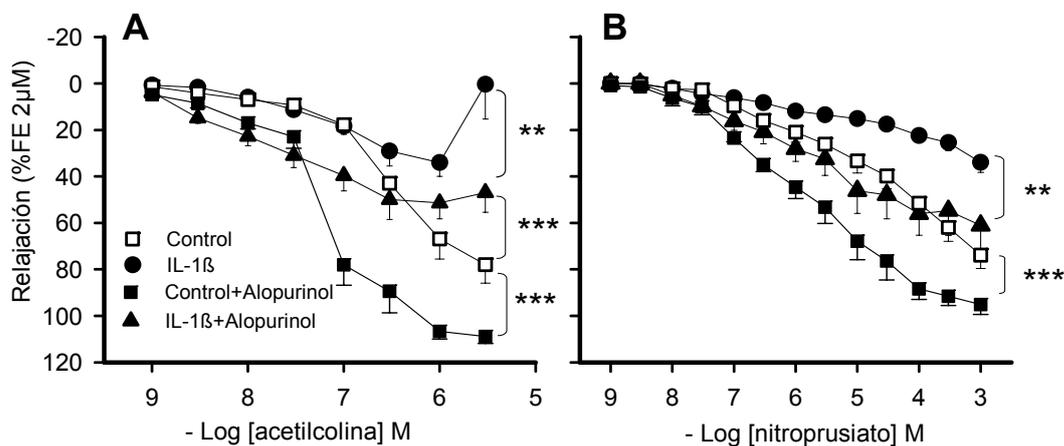


Figura 45. Efecto de alopurinol (1 mM) sobre las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (A) y a nitroprusiato sódico (B) en AMRs precontraídas con fenilefrina (FE) de arterias incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-12 animales. **p<0.01; ***p<0.001 mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

3.4.3 Papel de la NADPH oxidasa en el empeoramiento de las relajaciones inducido por IL-1 β

Para determinar si la NADPH oxidasa participa en el empeoramiento de la relajación a ACh inducida por IL-1 β , se estudió el efecto de apocinina sobre las relajaciones a ACh y a NPS (Figura 46).

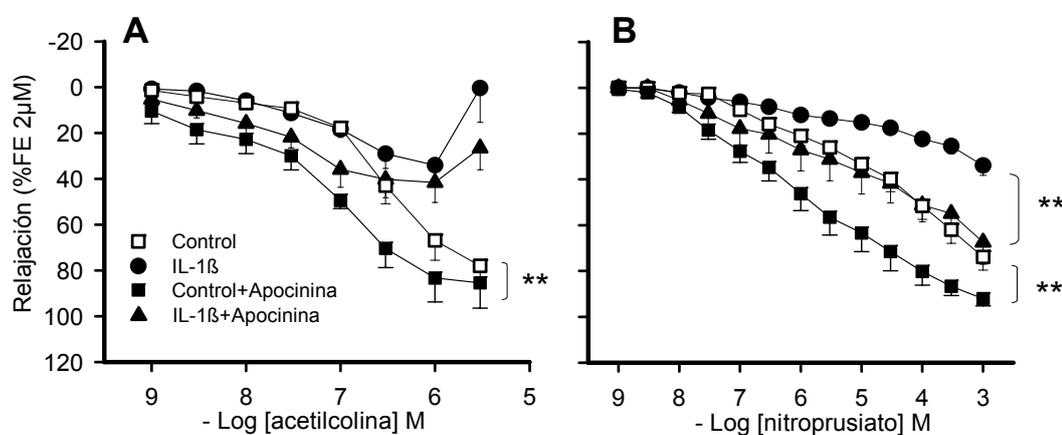


Figura 46. Efecto de apocinina (0.3 mM) sobre las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (A) y a nitroprusiato sódico (B) en AMRs precontraídas con fenilefrina (FE) de arterias incubadas (14 h) en medio de cultivo en ausencia (Control) o en presencia de IL-1 β . Cada punto representa la media \pm e.s.m. de 6-12 animales. ** $p < 0.01$ mediante ANOVA de dos vías (concentración y tratamiento) con medidas repetidas en el factor concentración.

Apocinina (0.3 mM) mejoró el empeoramiento de la relajación a ACh y a NPS observado en arterias incubadas en medio de cultivo en ausencia de

IL-1 β . Además, mejoró el empeoramiento de la relajación a NPS de arterias incubadas con IL-1 β . Sin embargo, apocinina no mejoró significativamente el empeoramiento de la relajación a ACh producido por IL-1 β (Figuras 46A y 46B). Al igual que ocurrió con alopurinol, en arterias tratadas con IL-1 β la respuesta relajante a ACh en presencia de apocinina no alcanzaron los valores obtenidos en arterias control (Figura 46).

DISCUSIÓN

La isquemia cerebral está asociada a una respuesta inflamatoria que va acompañada por un aumento en las citoquinas circulantes (Hopkins, 2003; Allan y Stock, 2004; Chamorro, 2004). A nivel periférico, las citoquinas producen cambios vasculares como hipotensión y disminución de las respuestas vasoconstrictoras de arterias de conductancia (Julou-Schaeffer y cols., 1990; Rees y cols., 1990). Sin embargo, en arterias de resistencia el efecto de las citoquinas inflamatorias está poco estudiado (Vila y Salaices, 2005). Una de las muchas funciones atribuidas a las citoquinas como el TNF- α , la IL-1 β o la IL-6 es su participación en el proceso de remodelado vascular (Ono y cols., 1998; Irwin y cols., 1999). En este sentido, la presencia de IL-1 β se ha asociado a una disminución del procolágeno α_1 , α_2 y del mRNA del procolágeno α_1 , así como a un aumento de la MMP-13, -2 y -9 (Siwik y cols., 2000). Además, en diversas enfermedades vasculares en las que los niveles de citoquinas circulantes aumentan, se han observado cambios en el número de células adventicias, CMLs y células endoteliales (Arribas y cols., 1997a). Estos cambios podrían reflejarse, por tanto, en una alteración de la estructura vascular y de las propiedades mecánicas de las arterias.

Para el estudio del efecto de las citoquinas inflamatorias sobre la estructura y mecánica vasculares hemos utilizado un modelo de proceso

inflamatorio *in vitro* mediante incubación de las arterias con IL-1 β . Los resultados obtenidos en este estudio no mostraron efecto de la IL-1 β sobre la estructura o la mecánica de las arterias de resistencia, si bien, como muestran los resultados del AST, existe una tendencia a la hipertrofia vascular. La concentración de IL-1 β utilizada en este estudio parece estar dentro del rango patológico observado en humanos (Bruunsgaard y cols., 1999) y ratones (Saito y cols., 2003) y coincide con la utilizada por otros autores en cultivos tisulares (White y cols., 2002). Sin embargo, el tiempo de aparición de la inducción de la expresión de diversas citoquinas después de una isquemia cerebral varía mucho entre estudios (Allan y Stock, 2004). En este sentido, se ha descrito que después de una isquemia cerebral focal en ratas, el ARNm de la IL-1 β presenta su punto máximo de expresión entre las 6 y las 12 h (Berti y cols., 2002). En cambio, otro estudio en ratas sometidas a isquemia-reperfusión detectó aumentos en la expresión proteica de IL-1 β a partir de la cuarta hora alcanzándose el máximo de expresión después de 3 días (Legos y cols., 2000). Por tanto, es posible que el período de incubación de 14 h sea insuficiente para producir cambios en la estructura y mecánica de las arterias. Además, dado que la isquemia cerebral está asociada a la liberación simultánea de varias citoquinas (Allan y Stock., 2004; Chamorro, 2004), podría ser necesaria la presencia conjunta de varias citoquinas para inducir cambios en la estructura o mecánica vasculares como los observados

en la isquemia-reperfusión. Sin embargo, este tiempo de incubación es suficiente para producir alteraciones funcionales importantes en vasos de resistencia como el empeoramiento de las relajaciones dependientes de NO. En este sentido, se ha sugerido que el incremento observado en los niveles de citoquinas en diversas patologías vasculares como la isquemia-reperfusión podría ser el responsable del empeoramiento de la función endotelial descrito en estas patologías (Riedemann y cols., 2003; Viridis y cols., 2005). Recientemente, Briones y cols. (2005b) demostraron que la incubación de arterias de resistencia con IL-1 β induce la expresión de enzimas inflamatorias como iNOS y COX-2 y que sus derivados participan en el mantenimiento del tono vascular afectando tanto a las respuestas contráctiles como a las vasodilatadoras. Así, estos autores demostraron que la incubación prolongada de AMR con IL-1 β produjo un empeoramiento de la relajación dependiente de NO. En el presente trabajo, se han confirmado esos resultados y se han analizado los mecanismos involucrados en dicho empeoramiento.

La ACh produce relajación dependiente de endotelio en AMR mediada, en parte, por liberación de NO (Viridis y cols., 2005). No obstante, algunos estudios en AMR indican que el EDHF participa en la relajación inducida por ACh (Sekiguchi y cols., 2002; Chauhan y cols., 2003). En el presente trabajo hemos demostrado que en nuestras condiciones

experimentales en arterias control, la relajación a ACh está mediada sólo por NO ya que dicha relajación fue bloqueada por la incubación con L-NAME. Puesto que la incubación con IL-1 β disminuyó la relajación a ACh de manera similar en ausencia o en presencia de L-NAME, nuestros resultados indican que en presencia de IL-1 β , no hay mediadores adicionales en la relajación producida por ACh y que el empeoramiento de la relajación a ACh podría ser debido a una disminución en la biodisponibilidad del NO.

Alteraciones en la síntesis y/o en el efecto del NO podrían explicar el efecto depresor inducido por IL-1 β en la vasodilatación producida por ACh. En un sistema de cocultivo, se observó que las CMLs tratadas con IL-1 β disminuyeron la expresión de eNOS en las células endoteliales (De Frutos y cols., 1999). Además, TNF- α empeoró la estabilidad del mRNA de eNOS (Yoshizumi y cols., 1993). Sin embargo, en el presente trabajo no se observaron diferencias en la expresión de eNOS después del tratamiento con IL-1 β . Por otro lado, las respuestas vasodilatadoras a NPS, donador exógeno de NO, pero no a papaverina, fármaco relajante independiente de la liberación de NO, fueron empeoradas por IL-1 β , sugiriendo que el efecto de la IL-1 β es selectivo para la relajación mediada por NO.

El NO produce relajación, entre otros mecanismos, estimulando a la GCs, que a su vez aumenta los niveles de GMPc en la musculatura lisa vascular. En nuestra situación experimental, no encontramos diferencias ni

en la expresión de la GCs ni en la vasodilatación mediada por el análogo del GMPc, 8-BrGMPc. Estos resultados excluyen cambios en la cantidad de enzima o en la sensibilidad de músculo liso a la acción del GMPc, como responsables del empeoramiento en las relajaciones a NO producido por IL-1 β . De acuerdo con estos resultados, Tsuchida y cols. (1994) observaron que las respuestas a 8-Br-GMPc no estaban alteradas por lipopolisacárido bacteriano.

Las respuestas inflamatorias están asociadas a incrementos en la producción de O₂⁻ (Guzik y cols., 2003; Salvemini y cols., 2003). El O₂⁻ formado puede inactivar al NO reduciendo la biodisponibilidad del mismo dando lugar a disfunción vascular (Hamilton y cols., 2002). Nuestros resultados en AMRs muestran que la IL-1 β incrementó significativamente la formación de O₂⁻ en las tres capas de la pared vascular. En este sentido, se ha observado que la presencia de lipopolisacárido incrementa la producción de O₂⁻ en aorta de rata (Brandes y cols., 1999) y en arteria cerebral media (Hernanz y cols., 2003). Basándonos en estos resultados, podemos hipotetizar que una disminución en la disponibilidad de NO inducida por un exceso de O₂⁻ podría ser responsable de la disfunción endotelial observada después del tratamiento con IL-1 β . El hecho de que la PEG-SOD, análogo permeable a la membrana de la SOD, revirtiera el empeoramiento de la

relajación a ACh y el incremento en la producción de O_2^- , apoya esta hipótesis.

La incubación con medio de cultivo produjo un efecto similar, aunque menos severo, al producido por IL-1 β . Así, en ausencia de IL-1 β , se observó un pequeño incremento en la producción de O_2^- , que correlacionaba con el desplazamiento hacia la derecha de la curva concentración-respuesta a ACh comparada con la curva concentración-respuesta a ACh en vasos recién extraídos del lecho vascular. De acuerdo con estos resultados, la incubación con PEG-SOD revirtió de manera parcial, el empeoramiento de la relajación a ACh producido por la incubación en el medio de cultivo. No podemos descartar que en estas arterias pudiese existir daño endotelial o cambios en la señalización para la ACh. Sin embargo, resultados previos en AMR de ratas jóvenes y viejas mostraron que la incubación prolongada con IL-1 β no producía cambios ni en la distribución ni en la integridad de las células endoteliales (Briones y cols., 2005b) excluyendo cambios morfológicos en células endoteliales como responsables del empeoramiento en la relajación de ACh observada. Otros mediadores distintos del O_2^- también podrían estar participando en el empeoramiento de las respuestas a ACh observado en las arterias incubadas en ausencia de IL-1 β . En este sentido, Briones y cols. (2005b) observaron en arterias incubadas en medio de cultivo, una gran producción de prostanoïdes contráctiles que podrían participar en el

empeoramiento de la relajación endotelio-dependiente (Hernanz y cols., 2004b). El origen de las alteraciones inducidas por el medio de cultivo no está claro. Un posible factor implicado podría ser la prolongada exposición a pequeñas cantidades de lipopolisacárido en el medio de cultivo “estéril” (McKenna y cols., 1994). Por otro lado, se ha descrito que la incubación de las arterias en medio de cultivo podría originar la síntesis vascular de citoquinas que podrían participar en la producción de O_2^- (Newman y cols., 1996). En esta línea, Wylam y cols. (2001) demostraron que el medio de incubación *per se* producía alteraciones en las respuestas vasculares añadidas a las inducidas por lipopolisacárido.

La NADPH oxidasa es una de las principales fuentes de O_2^- a nivel vascular que puede modularse por citoquinas o por estímulos inflamatorios (Griendling y cols., 2000; Zalba y cols., 2001; Touyz y Schiffrin, 2004; Brandes y Kreuzer, 2005). El inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina, mejoró las respuestas a ACh y a NPS de vasos incubados en ausencia de IL-1 β , apoyando la participación de esta enzima en la producción basal de O_2^- . Otros estudios han descrito que la NADPH oxidasa participa en la generación de O_2^- inducida por TNF- α (Ungvari y cols., 2003) y en los cambios en la vasoconstricción inducidos por lipopolisacárido (Hernanz y cols., 2003). En el presente trabajo, la IL-1 β aumentó la expresión de p22^{phox} y la producción de O_2^- , de acuerdo con los resultados obtenidos en aorta de rata después del

tratamiento con lipopolisacárido (Brandes y cols., 1999). Además, apocinina mejoró el empeoramiento de las respuestas vasodilatadoras inducido por NPS en presencia de IL-1 β , sugiriendo la existencia de mayor biodisponibilidad de NO. Sin embargo, este fármaco no modificó los efectos de la IL-1 β en la relajación a ACh, descartando así la participación de la NADPH oxidasa en este efecto.

La enzima xantina oxidasa puede también estar involucrada en la producción de O₂⁻ (Cai y Harrison, 2000). En nuestro trabajo, la IL-1 β incrementó la expresión de xantina oxidasa, lo que corrobora los datos obtenidos en aorta tratada con lipopolisacárido (Brandes y cols., 1999). La participación de esta enzima en la disfunción arterial observada después del tratamiento con IL-1 β fue confirmada por el hecho de que el alopurinol: 1) disminuyó el empeoramiento de la relajación a ACh, 2) revirtió el empeoramiento de la relajación a NPS y 3) disminuyó la producción de O₂⁻. En ACM, se ha demostrado que el alopurinol disminuyó el efecto del lipopolisacárido en las respuestas a serotonina (Hernanz y cols., 2003). Por el contrario, en arterias coronarias hiperhomocistinémicas, el alopurinol no afectó al incremento en la generación de O₂⁻ (Ungvari y cols., 2003). En condiciones control, este fármaco también mejoró el empeoramiento de la relajación a ACh y a NPS, apoyando la participación de esta enzima en la generación de O₂⁻, en esta situación experimental. Es difícil determinar si la

mejoría producida por el alopurinol sobre el empeoramiento de las respuestas a ACh producido por IL-1 β se debe a la inhibición del O₂⁻ basal o a la disminución del O₂⁻ inducido por IL-1 β . El hecho de que el alopurinol disminuyera la producción de O₂⁻ en arterias incubadas con IL-1 β sugiere que el efecto del alopurinol sobre las respuestas a ACh podría ser debido a una disminución en la producción, tanto basal como estimulada, de O₂⁻.

La incubación con IL-1 β aumentó la expresión de iNOS y la producción de nitritos. Estos resultados concuerdan con los descritos en AMR de ratas jóvenes y viejas incubadas con IL-1 β (Briones y cols., 2005b). Existen estudios que demuestran la participación del NO generado por la iNOS en el empeoramiento de las respuestas relajantes dependientes de endotelio inducidas por IL-1 β o por lipopolisacárido en carótida de conejo (Kessler y cols., 1997) y en ACM de rata (Hernanz y cols., 2004b). En arterias tratadas con IL-1 β , el inhibidor de la iNOS 1400W, mejoró la relajación producida por NPS, pero no afectó al empeoramiento de la relajación a ACh producido por IL-1 β . Estos resultados excluyen la participación de la iNOS sobre el efecto de IL-1 β en la relajación a ACh. Por otro lado, se ha sugerido que el NO producido por citoquinas podría regular la formación de especies reactivas de oxígeno a través de la modulación de los sistemas de generación de O₂⁻ como la NADPH oxidasa (Kaur y cols., 2004). Por tanto, si este fuese el caso, disminuyendo la producción de NO procedente de iNOS,

podría disminuir la producción de O_2^- procedente de dichas fuentes aumentando la biodisponibilidad de NO. Este mecanismo podría contribuir por tanto, a mejorar el empeoramiento de las relajaciones a NPS inducido por IL-1 β . Nuestros resultados parecen apuntar en esa dirección, dado que la apocinina también mejoró el empeoramiento de la relajación a NPS producido por IL-1 β .

El hallazgo de que todos los inhibidores mejoraron el empeoramiento de la vasodilatación a NPS, pero sólo alopurinol fuese capaz de mejorar parcialmente la relajación a ACh en vasos incubados con IL-1 β es sorprendente. El NO sintetizado por la eNOS debe cruzar dos membranas plasmáticas y el espacio entre el endotelio y el músculo liso antes de poder activar a la GCs. Sin embargo, el NPS libera NO directamente a las CMLs, por lo que este NO se encuentra más próximo a la GCs que el NO derivado de la ACh. En estas circunstancias, el NO endotelial sería más susceptible a la inactivación por el O_2^- producido, tanto en el músculo liso como en las células endoteliales, que el NO que proviene del NPS, que sería fácilmente inactivado por el O_2^- presente en las CMLs. Este hipotético mecanismo ayudaría a explicar que la recuperación de las respuestas inducidas por NPS fuera superior a la recuperación de las relajaciones inducidas por ACh, cuando la cantidad de O_2^- disminuye. Esta hipótesis ya fue sugerida por Gunnett y cols. (2000) en arteria carótida de ratones IL-10 $^{-/-}$, para explicar los

diferentes efectos del lipopolisacárido sobre las respuestas vasodilatadoras a ACh y a NPS a pesar del incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$.

Estos resultados indican que la incubación prolongada con IL-1 β produce un exceso de $O_2^{\cdot-}$, sintetizado principalmente por la xantina oxidasa y en menor grado por la NADPH oxidasa, que juega un papel crucial en el empeoramiento de las relajaciones mediadas por NO en AMRs. El $O_2^{\cdot-}$ formado podría unirse al NO produciendo ONOO $^-$, reduciendo así la biodisponibilidad de NO derivado del endotelio que, a su vez, participaría en la disfunción endotelial. Sin embargo, los efectos de la IL-1 β no pueden ser explicados únicamente por la disminución de la biodisponibilidad de NO. Se sabe que las citoquinas actúan de manera sinérgica en la iniciación de la cascada inflamatoria dando lugar a la expresión de otras citoquinas, receptores para citoquinas y genes que sintetizan varios mediadores, los cuales pueden afectar a su vez a la función vascular (Vila y Salaices, 2005). En este sentido, está ampliamente descrito que varias enfermedades cardiovasculares como la insuficiencia cardíaca congestiva, la arterioesclerosis, el shock séptico, la diabetes, la hipertensión y la isquemia-reperfusion están asociadas a niveles altos de citoquinas. Nuestros resultados apoyan la participación de la IL-1 β como mediador de la disfunción endotelial que se describe en esta patología vascular.

CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos hemos agrupado las conclusiones en dos apartados:

A. La isquemia-reperfusión:

- Produce *remodelado hipertrófico compensado* en la ACM ipsilateral debido a un aumento en su diámetro externo acompañado de un incremento en el grosor de la pared, en el AST y en la relación pared:luz.
- Aumenta el número de células adventicias y el volumen de la capa adventicia en ACMs ipsilaterales y contralaterales. Este aumento es probablemente el responsable del incremento del tamaño de la pared arterial. Los efectos observados en las arterias contralaterales parecen indicar la participación de alteraciones sistémicas debidas a la isquemia focal.
- Disminuye el estrés de la pared de las arterias ipsilaterales como consecuencia de la adaptación geométrica que se produce para compensar el posible aumento en la presión intravascular producida después de la isquemia.
- Aumenta la elasticidad intrínseca de la pared en los vasos ipsilaterales probablemente como consecuencia del aumento en el tamaño de las ventanas de la LEI.
- Produce una disminución del tono miogénico tanto en los vasos del lado ipsilateral como del lado contralateral. Uno de los factores implicados en este empeoramiento podría ser el incremento de O_2^- .

Estos mecanismos permitirían a las arterias adaptarse a los cambios en el flujo sanguíneo necesarios para reducir el daño neuronal, mejorando la irrigación del cerebro después de un período de isquemia-reperusión

B. La incubación prolongada de AMRs con IL-1 β :

- No modifica ni la estructura ni la mecánica de la pared arterial.
- Empeora las relajaciones dependientes de NO sin afectar a la capacidad vasodilatadora general del vaso. El empeoramiento de la relajación se debe, al menos en parte, a una disminución en la biodisponibilidad del NO.
- Aumenta la producción de O₂⁻ en la pared vascular que parece estar sintetizado principalmente por la xantina oxidasa. Los O₂⁻ producidos por acción de la xantina oxidasa son los principales responsables de la disminución en la biodisponibilidad del NO que a su vez es la responsable del empeoramiento de las respuestas relajantes mediadas por NO. Además nuestros resultados apuntan a la NADPH oxidasa y a la iNOS como responsables adicionales del empeoramiento de las relajaciones a NPS inducido por IL-1 β .

BIBLIOGRAFÍA

Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A, Buisson A, Vivien D (2000) Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:956-966.

Allan S y Stock C (2004) Cytokines in stroke. *Ernst Schering Res Found Workshop* 47:39-66.

Andresen J, Shafi NI, Bryan RM Jr (2006) Endotelial influences on cerebral tone. *J Appl Physiol* 100:318-327.

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348:730-732.

Arribas SM, González C, Graham D, Dominiczak AF, McGrath JC (1997a) Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy. *J Hypertens* 15:1685-1693.

Arribas SM, Hillier C, González C, McGrory S, Dominiczak AF, McGrath JC (1997b) Cellular aspects of vascular remodeling in hypertension revealed by confocal microscopy. *Hypertension* 30:1455-1464.

Arribas SM, Daly CJ, McGrath IC (1999) Measurements of vascular remodeling by confocal microscopy. *Methods Enzymol* 307:246-273.

Arribas SM, Hinek A, González MC (2006) Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther; en prensa*.

Bancroft J y Stevens A (1982) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, New York.

Baumbach GL y Heistad DD (1989) Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13:968-972.

Berti R, Williams AJ, Moffett JR, Hale SL, Velarde LC, Elliott PJ, Yao C, Dave JR, Tortella FC (2002) Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1068-1079.

Bishop-Bailey D, Hla T, Mitchell JA (1999) Cyclo-oxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Int J Mol Med* 3:41-48.

Blomfield J y Farrar JF (1969) The fluorescent properties of maturing arterial elastin. *Cardiovasc Res* 3:161-170.

Bonnin CM, Sparrow MP, Taylor RR (1981) Collagen synthesis and content in right ventricular hypertrophy in the dog. *Am J Physiol* 241:708-713.

Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, Mugge A (1999) Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension* 33:1243-1249.

Brandes RP y Kreuzer J (2005) Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 65:16-27.

Bridges EJ, Dukes S (2005) Cardiovascular aspects of septic shock: pathophysiology, monitoring, and treatment. *Crit Care Nurse* 25:14-16.

Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, González MC, McGrath JC, Arribas SM (2003) Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* 552:185-195.

Briones AM, Montoya N, Giraldo J, Vila E (2005a) Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autacoid Pharmacol* 25:155-162.

Briones AM, Salaices M, Vila E (2005b) Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1beta exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev* 126:710-721.

Briones AM, Xavier FE, Arribas SM, González MC, Rossoni LV, Alonso MJ, Salaices M (2006) Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain induced hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK (1999) Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin Exp Immunol* 118:235-241.

Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23:374-380.

Cai H y Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844.

Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2:396-409.

Castellanos M, Castillo J, Garcia MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, Davalos A (2002) Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target. *Stroke* 33:982-987.

Cervera A, Justicia C, Reverter JC, Planas AM, Chamorro A (2004) Steady plasma concentration of unfractionated heparin reduces infarct volume and prevents inflammatory damage after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurosci Res* 77:565-572.

Chamorro A (2004) Role of inflammation in stroke and atherothrombosis. *Cerebrovasc Dis* 17:1-5.

Chauhan, S., Rahman, A., Nilsson, H., Clapp, L., Macalister, R., Ahluwalia, A (2003). NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries : a role for NO stores. *Cardiovasc. Res* 57:207-216.

Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E (2005) Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11:194-205.

Christ GJ, Spray DC, el-Sabban M, Moore LK, Brink PR (1996) Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res* 79:631-646.

Christensen KL y Mulvany MJ (2001) Location of resistance arteries. *J Vasc Res* 38:1-12.

Cipolla MJ, McCall AL, Lessov N, Porter JM (1997) Reperfusion decreases myogenic reactivity and alters middle cerebral artery function after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 28:176-180.

Cipolla MJ y Osol G (1998) Vascular smooth muscle actin cytoskeleton in cerebral artery forced dilatation. *Stroke* 29:1223-1228.

Cipolla MJ, Lessov N, Hammer ES, Curry AB (2001) Threshold duration of ischemia for myogenic tone in middle cerebral arteries: effect on vascular smooth muscle actin. *Stroke* 32:1658-1664.

Coats P y Hillier C (1999) Determination of an optimal axial-length tension for the study of isolated resistance arteries on a pressure myograph. *Exp Physiol* 84:1085-1094.

Coats P (2003) Myogenic, mechanical and structural characteristics of resistance arterioles from healthy and ischaemic subjects. *Clin Sci (Lond)* 105:683-689.

Coulson RJ, Chesler NC, Vitullo L, Cipolla MJ (2002) Effects of ischemia and myogenic activity on active and passive mechanical properties of rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:2268-2275.

De Backer D, Creteur J, Preiser JC (2002) Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166:98-104.

Debelle L y Tamburro AM (1999) Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 31:261-272.

Deby C y Goutier R (1990) New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 39:399-405.

De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL (2005) Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2106-2113.

De Frutos T, de Miguel LS, Garcia-Duran M, González-Fernandez F, Rodriguez-Feo JA, Monton M, Guerra J, Farre J, Casado S, Lopez-Farre A (1999) NO from smooth muscle cells decreases NOS expression in endothelial cells: role of TNF- α . *Am J Physiol* 277:1317-1325.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.

Dejana E, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 9:910-908.

Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI, Fabiani ME (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond)* 100:481-492.

Dobrin PB (1978) Mechanical properties of arterises. *Physiol Rev* 58:397-460.

Dorrance AM, Rupp N, Pollock DM, Newman JW, Hammock BD, Imig JD (2005) An epoxide hydrolase inhibitor, 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid (AUDA), reduces ischemic cerebral infarct size in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:842-848.

Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD (1989) Myogenic mechanisms in the cerebral circulation. *J Hypertens Suppl* 7:61-64.

Faury G (2001) Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol Biol (Paris)* 49:310-325.

Feletou M y Vanhoutte PM (2006) Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. Where Are We Now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; en prensa.

Folkow B, Grimby G, Thulesius O (1958) Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. *Acta Physiol Scand* 44:255-272.

Fortuno A, Jose GS, Moreno MU, Diez J, Zalba G (2005) Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol* 90:457-462.

Fox SI (1993) Human Physiology. Brown Publishers.

Fukayama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y, Nakazawa H (1998) Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:123-129.

Galis ZS y Khatri JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90:251-262.

Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 16:23-30.

González JM, Briones AM, Starcher B, Conde MV, Somoza B, Daly C, Vila E, McGrath I, González MC, Arribas SM (2005) Influence of elastin on rat small artery mechanical properties. *Exp Physiol* 90:463-468.

González JM, Briones AM, Somoza B, Daly CJ, Vila E, Starcher B, McGrath JC, González MC, Arribas SM (2006) Postnatal alterations in elastic fiber organization precede resistance artery narrowing in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; en prensa.

Grabowski M, Mattsson B, Nordborg C, Johansson BB (1993) Brain capillary density and cerebral blood flow after occlusion of the middle cerebral artery in normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 11:1363-1368.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501.

Griswold DE y Adams JL (1996) Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* 16:181-206.

Grover AK y Samson SE (1988) Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am J Physiol* 255:297-303.

Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-456.

Gunneth CA, Heistad DD, Berg DJ, Faraci FM (2000) IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:1555-1562.

Gutteridge JMC, Westermarck T, Halliwell B (1986) Oxygen radical damage in biological systems. *Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases* (Johnson Jr JE, Walford R, Harman D y Miquel J Alan R Liss eds) pp 99-139, New York.

Gutterman DD (1999) Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol* 277:1265-1272.

Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM (2002) Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension* 39:1088-1094.

Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54:469-487.

Hamilton CA, Brosnan MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczak AF (2002) NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension* 40:755-762.

Haudenschild CC, Prescott MF, Chobanian AV (1981) Aortic endothelial and subendothelial cells in experimental hypertension and aging. *Hypertension* 3:148-153.

Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B (1992) Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281:627-630.

Heiss WD, Sobesky J, Hesselmann V (2004) Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage. *Stroke* 35:2671-2674.

Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M (2003) Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 140:671-680.

Hernanz R, Alonso MJ, Zibrandtsen H, Alvarez Y, Salaices M, Simonsen U (2004a) Measurements of nitric oxide concentration and hyporeactivity in rat superior mesenteric artery exposed to endotoxin. *Cardiovasc Res* 62:202-211.

Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salaices M (2004b) Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:225-234.

Herrmann J, Samee S, Chade A, Rodriguez Porcel M, Lerman LO, Lerman A (2005) Differential effect of experimental hypertension and hypercholesterolemia on adventitial remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:447-453.

Heymes C, Habib A, Yang D, Mathieu E, Marotte F, Samuel J, Boulanger CM (2000) Cyclo-oxygenase-1 and -2 contribution to endothelial dysfunction in ageing. *Br J Pharmacol* 131:804-810.

Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248:550-556.

Hinshaw LB (1996) Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 24:1072-1078.

Hirst GD y Edwards FR (1989) Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev* 69:546-604.

Hopkins SJ (2003) The pathophysiological role of cytokines. *Legal Med* 45-57.

Hou ST y MacManus JP (2002) Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int Rev Cyto* 221:93-148.

Huang AL y Vita JA (2006) Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilatation. *Trends Cardiovasc Med* 16:15-20.

Iadecola C (1998) Cerebral circulatory dysregulation in ischemia. En: *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Ginsberg MD y Bogousslavsky J eds) pp 319-357, Blackwell Science, Massachusetts.

Intengan HD y Schiffrin EL (2000) Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36:312-318.

Intengan HD y Schiffrin EL (2001) Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38:581-587.

Ito Y, Pagano PJ, Tornheim K, Brecher P, Cohen RA (1996) Oxidative stress increases glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta. *Am J Physiol* 270:81-87.

Irwin MW, Mak S, Mann DL, Qu R, Penninger JM, Yan A, Dawood F, Wen WH, Shou Z, Liu P (1999) Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 99:1492-1498.

Iwatsuki K, Kumura E, Yoshimine T, Yamamoto K, Sato M, Hayakawa T (1998) Increase in jugular levels of polymorphonuclear neutrophil elastase in patients with acute cerebral infarction. *Neurol Res* 20:397-402.

Izzard AS, Graham D, Burnham MP, Heerkens EH, Dominiczak AF, Heagerty AM (2003) Myogenic and structural properties of cerebral arteries from the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:1489-1494.

Jacob MP (1993) Elastin: preparation, characterization, structure, biosynthesis and catabolism. *C R Seances Soc Biol Fil* 187:166-180.

Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB (2001) Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris)* 49:326-332.

Jacob MP (2003) Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 57:195-202.

Johansson B (1989) Myogenic tone and reactivity: definitions based on muscle physiology. *J Hypertens Suppl* 7:5-8.

Jugdutt BI (2003) Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 108:1395-1403.

Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC (1990) Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 259:1038-1043.

Justicia C, Martin A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panes J, Chamorro A, Planas AM (2006) Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:421-432.

Kantachuvesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I, Kotelevtsev Y, Mullins JJ (2001) Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem* 276:36727-36733.

Kaur J, Dhaunsi GS, Turner RB (2004) Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells. *Med Princ Pract* 13:26-29.

Kessler P, Bauersachs J, Busse R, Schini-Kerth VB (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1746-1755.

Khan KN, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trump BF, Maziasz TJ, Alden CL (1998) Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 26:612-620.

Kobs RW y Chesler NC (2006) The Mechanobiology of Pulmonary Vascular Remodeling in the Congenital Absence of eNOS. *Biomech Model Mechanobiol*; en prensa.

Korthuis RJ y Granger DN (1986) Physiology of Oxygen Radicals (Taylor AE, Matalon S y Ward PA eds), Williams & Wilkins, Baltimore.

Krick S, Hanze J, Eul B, Savai R, Seay U, Grimminger F, Lohmeyer J, Klepetko W, Seeger W, Rose F (2005) Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system. *FASEB J* 19:857-859.

Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki KI, Yamanaka K, Tanaka S, Hayakawa T, Shiga T, Kosaka H (1996) Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am J Physiol* 270:748-752.

Lagaud G, Davies KP, Venkateswarlu K, Christ GJ (2002) The physiology, pathophysiology and therapeutic potential of gap junctions in smooth muscle. *Curr Drug Targets* 3:427-440.

Lagente V, Manoury B, Nenan S, Le Quement C, Martin-Chouly C, Boichot E (2005) Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 38:1521-1530.

Lee RM (1995) Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* 66:149-73.

Legos JJ, Whitmore RG, Erhardt JA, Parsons AA, Tuma RF, Barone FC (2000) Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat. *Neurosci Lett* 282:189-192.

Levick JR (2003) An introduction to cardiovascular physiology (Koster J y Ueberberg A eds), Arnold, London.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Lu LF y Fiscus RR (1999) Interleukin-1beta causes different levels of nitric oxide-mediated depression of contractility in different positions of rat thoracic aorta. *Life Sci* 64:1373-1381.

Maneen MJ, Hannah R, Vitullo L, DeLance N, Cipolla MJ (2006) Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associated with decreased vascular smooth muscle F-actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke* 37:894-899.

Marin J y Rodriguez-Martinez MA (1995) Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol* 15:279-307.

Marin J y Rodriguez-Martinez MA (1997) Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 75:111-134.

Mayne R (1986) Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis*. 6:585-593.

McAuley MA (1995) Rodent models of focal ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7:153-180.

McGrath JC, Arribas SM, Daly CJ, Gordon JF (1995) Confocal microscopy for structure and real-time pharmacology in blood vessels. *J Hum Hypertens* 9:645-647.

McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E, Daly CJ (2005) New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* 90:469-475.

McKenna TM, Clegg JM, Williams TJ (1994) Protein kinase C is a mediator of lipopolysaccharide-induced vascular suppression in the rat aorta. *Shock* 2:84-89.

Mellander S (1989) Functional aspects of myogenic vascular control. *J Hypertens Suppl* 7:21-30.

Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19:151-167.

Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196:430-443.

Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82:1298-1305.

Milstien S y Katusic Z (1999) Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263:681-684.

Mombouli JV y Vanhoutte PM (1997) Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 18:252-256.

Moro MA, Darley-Usmar VM, Goodwin DA, Read NG, Zamora-Pino R, Feelisch M, Radomski MW, Moncada S (1994) Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6702-6706.

Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD (1996) Vascular remodeling. *Hypertension* 28:505-506.

Mulvany MJ (2002a) Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 4:49-55.

Mulvany MJ (2002b) Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 17:105-109.

Münzel T, Hink U, Heitzer T, Meinertz T (1999) Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone. *Ann N Y Acad Sci* 874:386-400.

Murrell GA, Francis MJ, Bromley I (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265:659-665.

Newby AC (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 85:1-31.

Newman WH, Zhang LM, Leeper-Woodford SK, Castresana MR (1996) Human blood vessels release tumor necrosis factor-alpha from a smooth muscle cell source. *Crit Care Med* 24:294-297.

O'Brien AJ, Wilson AJ, Sibbald R, Singer M, Clapp LH (2001) Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. *Br. J. Pharmacol* 133:351-360.

Okahara K, Sun B, Kambayashi J (1998) Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1922-1926.

Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S (1998) Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 98:149-156.

Osol G y Halpern W (1985) Myogenic properties of cerebral blood vessels from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol* 249:914-921.

Osol G (1995) Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 32:275-292.

Ospina JA, Duckles SP, Krause DN (2003) 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:241-250.

Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L (1990) Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 2:161-192.

Peskar BM (2005) Role of cyclooxygenase isoforms in gastric mucosal defense and ulcer healing. *Inflammopharmacology* 13:15-26.

Prockop DJ y Kivirikko KI (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-434.

Pryor WA (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48:657-667.

Quan N, Herkenham M (2002) Connecting cytokines and brain: a review of current issues. *Histol Histopathol* 17:273-288.

Rabelink TJ y Luscher TF (2006) Endothelial nitric oxide synthase: host defense enzyme of the endothelium? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:267-271.

Rees DD, Celtek S, Palmer RM, Moncada S (1990) Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 173:541-547.

Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB (1992) Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J* 6:2439-2449.

Rekhter MD (1999) Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc Res* 41:376-384.

Rhodin (1980) Handbook of physiology. The cardiovascular system (Bohr, Somlyo, Sparks eds) American Physiological Society, Bethesda, Maryland.

Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003) Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 9:517-524.

Robert L (2002) Elastin, past, present and future. *Pathol Biol (Paris)* 50:503-511.

Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R (1993) Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 7:1208-1218.

Ross R y Glomset JA (1976) The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 295:369-377.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:321-329.

Rundhaug JE (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9:267-285.

Saavedra JM (2005) Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* 25:485-512.

Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM (2003) Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev* 124:1047-1058.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348:732-735.

Salvemini D, Ischiropoulos H, Cuzzocrea S (2003) Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods Mol Biol* 225:291-303.

Sanchez-Ferrer CF y Marin J (1990) Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol* 21:589-603.

Schiffrin EL (1998) Endothelin: role in hypertension. *Biol Res* 31:199-208.

Schiffrin EL (2004) Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 17:1192-1200.

Schiffrin EL (2005) Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmac* 43; 19-29.

Schnittler HJ (1998) Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol* 93:30-39.

Sekiguchi F, Nakahira T, Kawata K, Sunano S (2002) Responses to endothelium-derived factors and their interaction in mesenteric arteries from Wistar-Kyoto and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:1066-1074.

Shadwick RE (1999) Mechanical design in arteries. *J Exp Biol* 202:3305-3313.

Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ (1991) Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J Clin Invest* 87:1828-1834.

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS (2000) Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 86:1259-1265.

Smith WL y Langenbach R (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107:1491.

Stanley ER, Guilbert LJ, Tushinski RJ, Bartelmez SH (1983) CSF-1—a mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. *J Cell Biochem* 21:151-159.

Stefanadis C, Vlachopoulos C, Karayannacos P, Boudoulas H, Stratos C, Filippides T, Agapitos M, Toutouzas P (1995) Effect of vasa vasorum flow on structure and function of the aorta in experimental animals. *Circulation* 91:2669-2678.

Stenmark KR, Bouchev D, Nemenoff R, Dempsey EC, Das M (2000) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: contribution of the adventitial fibroblasts. *Physiol Res* 49:503-517.

Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT, Frid MG (2005) Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. *J Appl Physiol* 98:715-721.

Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M (2006) Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* 21:134-145.

Sumpio BE, Riley JT, Dardik A (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1508-1512.

Telo P, Lostaglio S, Dejana E (1997) Structure of intercellular junctions in the endothelium. *Therapie* 52:395-398.

Touyz RM (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252.

Touyz RM y Schiffrin EL (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122:339-352.

Touyz RM (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 7:1302-1314.

Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, Mayhew TM (1996) Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 11:230-237.

Tsiotou AG y Sakorafas GH (2004) Management of septic shock:current concepts, with a particular emphasis on the role of source control, and future perspectives. *Eur J Anaesthesiol* 21:337-360.

Tsuchida S, Hiraoka M, Sudo M, Kigoshi S, Muramatsu I (1994) Attenuation of sodium nitroprusside responses after prolonged incubation of rat aorta with endotoxin. *Am J Physiol* 267:2305-2310.

Ungvari Z, Csiszar A, Edwards JG, Kaminski PM, Wolin MS, Kaley G, Koller A (2003) Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H

oxidase, and inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:418-424.

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2:997-1000.

Van der Poll T y van Deventer SJ (1999) Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 13:413-426.

Van der Rest M y Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J* 5:2814-2823.

Vane JR y Botting R (1991) Mediators from the endothelial cell. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 21:627-636.

Verrecchia F y Mauviel A (2004) TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal* 16:873-880.

Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A (2000) Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 31:2325-2329.

Vila E y Salaices M (2005) Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:1016-1021.

Virdis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M (2005) Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat

model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 312:945-953.

Visner GA, Chesrown SE, Monnier J, Ryan US, Nick HS (1992) Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 188:453-462.

Wali MA, Dewan M, Eid RA (2003) Histopathological changes in the wall of varicose veins. *Int Angiol* 22:188-193.

Wang JM, Griffin JD, Rambaldi A, Chen ZG, Mantovani A (1988) Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 141:575–579.

Wang Y y Walsh SW (1995) Aspirin inhibits both lipid peroxides and thromboxane in preeclamptic placentas. *Free Radic Biol Med* 18:585-591.

Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44:381-386.

Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC Jr, Cruickshank JM, Devereux RB, Giles TD, Korsgaard N, Leier CV, y cols. (1992) Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 20:3-16.

Welch G y Loscalzo J (1994) Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg* 9:361-371.

White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Bradley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, et al. (1994) Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1044-1048.

White LR, Juul R, Cappelen J, Aasly J (2002) Cyclooxygenase inhibitors attenuate endothelin ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. *Eur J Pharmacol* 448:51-57.

Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR (2000) COX-1, COX-2 and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 355:646-648.

Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD (2003) Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. *Br J Pharmacol* 138:1285-1294.

Wong LC y Langille BL (1996) Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. *Circ Res* 78:799-805.

Wu M, Pritchard KA Jr, Kaminski PM, Fayngersh RP, Hintze TH, Wolin MS (1994) Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am J Physiol* 266:2108-2113.

Wylam ME, Metkus AP, Umans JG (2001) Nitric oxide dependent and independent effects of in vitro incubation or endotoxin on vascular reactivity in rat aorta. *Life Sci* 69:455-467.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.

Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME (1993) Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73:205-209.

Zalba G, San Jose G, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, Diez J (2001) Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38:1395-1399.