

*UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE FARMACIA*



*DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y FARMACOLOGIA  
LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACOLOGIA*

*Efectos de pravastatina en la disfunción endotelial,  
estrés oxidativo y otros parámetros cardiovasculares*

*Modar Kassar  
Salamanca 2010*

Memoria que presenta Modar Kassan  
para optar al Grado de Doctor

*Salamanca, 2 de septiembre de 2010*



*Fdo. Modar Kassan*



FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Campus Miguel de Unamuno  
37007 Salamanca

Dña. M<sup>a</sup> **ÁNGELES SEVILLA TORAL** y Dña. M<sup>a</sup> **JOSÉ MONTERO GÓMEZ**, Profesoras de Farmacognosia y Farmacología, del Departamento de Fisiología y Farmacología, de la Universidad de Salamanca

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada "***Efectos de pravastatina en la disfunción endotelial, estrés oxidativo y otros parámetros cardiovasculares***", que presenta D. **Modar Kassan** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología (Departamento de Fisiología y Farmacología) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y, considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a dos de septiembre de dos mil diez.

Fdo. M<sup>a</sup> Ángeles Sevilla

Fdo. M<sup>a</sup> José Montero

**D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “**Efectos de pravastatina en la disfunción endotelial, estrés oxidativo y otros parámetros cardiovasculares**”, presentado por D. **Modar Kassan** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Dras. Dña. M<sup>a</sup> Ángeles Sevilla Toral y Dña. M<sup>a</sup> José Montero Gómez, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a dos de septiembre de dos mil diez.

Fdo. Rafael Jiménez Fernández

Modar Kassan ha recibido una beca de la Fundación Castilla-Leonesa de Cardiología (FUCALEC) durante la realización de este trabajo.

De esta memoria de Tesis Doctoral, hasta la fecha se han publicado los siguientes artículos:

- 1.- Kassan M, Montero MJ, Sevilla MA. In vitro antioxidant activity of pravastatin provides vascular protection. **Eur J Pharmacol.** 2010; 630:107-11.
- 2.- Kassan M, Montero MJ, Sevilla MA. Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. **Br J Pharmacol.** 2009; 158:541-7.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis agradecimientos.

Primero y antes que nada, doy gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Debo agradecer de manera especial y sincera a las Dras. María José Montero y María Ángeles Sevilla por aceptarme para realizar esta Tesis Doctoral bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta Tesis. Muchas gracias Profesoras.

Al Dr. José María González, jefe del Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, por facilitarme las muestras humanas que hemos utilizado en este trabajo, por su interés en el mismo y por sus oportunas gestiones que han hecho posible el poder disfrutar de una beca de la FUCALET.

Un agradecimiento especial al Dr. Luis San Román por la paciencia y el apoyo brindados desde siempre y sobre todo por esa gran amistad que me ofreció y me ofrece, por escucharme y aconsejarme siempre, a la Dra. Marisa Martín, por darme su ayuda cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño que me brinda y los ánimos que me da, a la Dra. Ana Vega Ortiz por los momentos en los que más que una profesora se comportó como una amiga, a la Dra. Rosalía Carrón por su apoyo y ánimo

A la Dra. Asunción Morán, que cuida de mi como si fuera mi madre, gracias por compartir conmigo tanto los momentos alegres como tristes, por tener siempre tendida su mano amiga, por escucharme, en fin, por darme cariño y amistad desde el día en que me conoció.

Para mis compañeros del laboratorio tengo sólo palabras de agradecimiento, ha sido un camino largo y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano. Quiero expresar mi agradecimiento especial a las Dras. Miriam Gómez y Carmen de la Calle quien fueron unas compañeras siempre generosas y que compartieron conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron de gran valor. A la Prof. Beatriz Restrepo y a la Dra. Estela Guerrero, por su amistad y cariño. Al Dr. David Sánchez quien, a pesar del corto tiempo que ha estado con nosotros, ha mostrado ser un gran profesional de amplia generosidad con sus conocimientos y experiencias. Su calidad personal es tal que rápidamente te sientes frente a un viejo amigo. Muchas gracias David. A Cristina, con la cual no sólo compartimos la fecha de nacimiento, sino el cariño y la amistad. Para el resto de compañeros: Sergio, Mónica, Rosa, Wassim, Catalina...mil y mil gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Para el resto de los miembros del Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología, vayan también mis más sinceros agradecimientos.

Quiero expresar mi agradecimiento especial al Dr. Mauricio, del Instituto del Cáncer, por su amistad y por su valiosa colaboración en los ensayos de biología molecular facilitando las instalaciones y los equipos adecuados para su preparación. En este mismo ámbito, agradezco a Teresa por su colaboración durante la realización de los estudios histológicos.

A Yehia, Zukaa, Nala y Nay, personas que desde el primer momento me brindaron todo el apoyo, colaboración y cariño sin ningún interés, son las personas por las cuales hoy por hoy puedo afirmar que, a pesar de haber venido solo a continuar mis estudios, jamás me he sentido así, porque ellos han estado a mi lado cada día durante estos años.

A Suhaila, por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

A Roula y a Rabih, mis amigos y mis otros hermanos que dios puso en mi camino para demostrarme que hay personas en este mundo que tienen un corazón enorme.

A Mari, Abdul, Abd, Lucita, Jamale, Sara, Suad, Laura, Blanca, Mazen, Leticia, Lucita, Med, Sanae, Ahmed, Carlos, Aitor y Zuhir, gracias por el aprecio que siempre me habéis demostrado y por brindarme vuestro apoyo en los momentos que más lo necesitaba.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Porque a pesar de no estar presentes físicamente, se que procuran mi bienestar desde mi país, Líbano, y está claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios de tercer ciclo no hubiesen sido posible. A mis padres, Ilham y Omar, por su ejemplo de lucha y honestidad; a mi hermano Adam por su tenacidad, superación, paciencia, inteligencia y generosidad y a mi hermano Amro por ser un ejemplo de valentía, capacidad y superación... por ellos y para ellos.

Finalmente, agradezco a los españoles y las españolas con quienes me he cruzado, por hacerme sentir en mi segundo país gracias a su amabilidad y su hospitalidad.

## ABREVIATURAS

<b>ACh:</b> Acetilcolina	<b>IPP:</b> Isopentanol-pirofosfato
<b>Akt:</b> Proteína cinasa B	<b>L-NAME:</b> N(G)monometil-L-arginina
<b>AMPc:</b> Adenosin monofosfato cíclico	<b>MCP-1:</b> Proteína quimiotáctica de monocitos
<b>Ang II:</b> Angiotensina II	<b>MDA:</b> Malonildialdehído
<b>ATP:</b> Trifosfato de adenosina	<b>MLC:</b> Cadena ligera de miosina
<b>BH<sub>4</sub>:</b> Tetrahidrobiopterina	<b>NADPH:</b> Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
<b>BK:</b> Bradicina	<b>NFκB:</b> Factor de transcripción κ-B
<b>CML:</b> Células musculares lisas	<b>nNOS:</b> Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>CMLV:</b> Células musculares lisas vasculares	<b>NO:</b> Óxido nítrico
<b>COX:</b> Ciclooxygenasa	<b>NTP:</b> Nitroprusiato sódico
<b>ECV:</b> Enfermedades cardiovasculares	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b> Anión superóxido
<b>EDHF:</b> Factor hiperpolarizante derivado del endotelio	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud
<b>EDRF:</b> Factor relajante derivado del endotelio	<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> Peroxinitrito
<b>eNOS:</b> Óxido nítrico sintasa endotelial	<b>PAI-1:</b> Inhibidor del activador plasminogeno
<b>ERO:</b> Especies reactivas de oxígeno	<b>PAS:</b> Presión arterial sistólica
<b>ET-1:</b> Endotelina-1	<b>PCR:</b> Proteína reactiva C
<b>FAD:</b> Flavin adenin dinucleótido	<b>PDGF:</b> Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>FE:</b> Fenilefrina	<b>PGH<sub>2</sub>:</b> Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>FRCV:</b> Factores de riesgo cardiovascular	<b>PGI<sub>2</sub>:</b> Prostaciclina
<b>GCs:</b> Guanilato ciclasa soluble	<b>SHR:</b> Ratas espontáneamente hipertensas
<b>GGPP:</b> Geranilgeranilpirofosfato	<b>SOD:</b> Superóxido dismutasa
<b>GMPc:</b> Guanosin monofosfato cíclico	<b>TBA:</b> Ácido tiobarbitúrico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Peróxido de hidrógeno	<b>TGF<sub>β</sub>:</b> Factor de crecimiento transformante β
<b>HMGCoA:</b> Hidroximetil-glutaril CoA	<b>TNF<sub>α</sub>:</b> Factor de necrosis tumoral α
<b>HTA:</b> Hipertensión arterial	<b>TP:</b> Receptor de tromboxano
<b>HVI:</b> Hipertrofia ventricular izquierda	<b>TXA<sub>2</sub>:</b> Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>IL-6:</b> Interleucina-6	<b>WKY:</b> Ratas Wistar Kyoto
<b>iNOS:</b> Óxido nítrico sintasa inducible	<b>XO:</b> Xantina oxidasa
<b>IP<sub>3</sub>:</b> Fosfatidil inositol trifosfato	



## *ÍNDICE*



## **OBJETIVOS**

1.- Objetivos y justificación.....	3
------------------------------------	---

## **INTRODUCCIÓN**

1.- Enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo .....	9
2.- Disfunción endotelial y patologías cardiovasculares .....	14
2.1.- Factores vasodilatadores derivados del endotelio.....	15
2.2.- Factores contracturantes derivados del endotelio .....	19
2.3.- Estrés oxidativo .....	22
2.4.- Disfunción endotelial en hipertensión arterial y aterosclerosis .....	27
3.- Estatinas y patologías cardiovasculares.....	31
3.1.- Efectos pleiotrópicos de las estatinas .....	36
- Estatinas y función endotelial .....	36
- Estatinas e inflamación .....	39
- Estatinas e hipertrofia cardíaca .....	41
- Estatinas y remodelado vascular.....	43
3.2.- Pravastatina.....	45

## **METODOLOGÍA Y RESULTADOS**

### **TRATAMIENTO CRÓNICO CON PRAVASTATINA**

1.- Diseño experimental.....	49
2.- Estudios <i>in vivo</i> .....	52
- Control de la presión arterial sistólica.....	52
3.- Niveles de colesterol.....	57
4.- Estudios <i>in vitro</i> .....	59
4.1.- Estudios de funcionalidad: arteria aorta .....	59
4.2.- Western blotting.....	73
4.3.- Estudios de funcionalidad: arterias mesentéricas .....	76

4.4.- Estudios de funcionalidad: riñón perfundido .....	81
5.- Estudios morfohistológicos en corazón .....	89
5.1.- Hipertrofia .....	89
5.2.- Área cardiomiocitos y fibrosis .....	89
6.- Estudios morfo-histológicos en arterias .....	99
- Morfometría de arteria aorta.....	100
- Morfometría de arterias intrarrenales .....	100
7.- Determinación del anión superóxido.....	108
8.- Peroxidación lipídica.....	112
9.- Niveles de nitritos en orina.....	114
 VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PRAVASTATINA	
1.- Efecto sobre la reactividad vascular.....	117
1.1.- Estudios en ratas SHR .....	117
1.2.- Estudios en ratas Wistar .....	118
2.- Efecto sobre la producción de anión superóxido .....	118
 ENSAYOS EN ARTERIAS HUMANAS	
1.-Efecto sobre la reactividad vascular.....	129
2.- Producción de anión superóxido .....	138
<i>DISCUSIÓN</i> .....	139
<i>CONCLUSIONES</i> .....	157
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	161

Objetivos 1

*OBJETIVOS*

## 2 Objetivos

## 1.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países de la Unión Europea y en los Estados Unidos de América (The World Health Report, 2009). También en España estas patologías constituyen la primera causa de defunción y presentan una morbilidad elevada, siendo la isquemia cardiaca la que ocasiona un mayor número de muertes (datos del Instituto Nacional de Estadística, I.N.E., 2009).

Estudios realizados en 2006–2007 en 22 países de Europa (Kotseva et al., 2009), incluido España, en pacientes menores de 80 años, con uno o más de los siguientes diagnósticos o procedimientos: cirugía de revascularización coronaria, angioplastia, infarto agudo de miocardio o isquemia mostraron que:

- El 56,0% eran hipertensos.
- El 52,7% tenían hipercolesterolemia.
- El 35,3% eran obesos.
- El 34,8% tenían diabetes.
- El 17,2% de los pacientes eran fumadores

Estos resultados avalan otros informes donde se pone de manifiesto que la hipertensión arterial (HTA) y la hipercolesterolemia son dos factores de riesgo cardiovascular (FRCV) claves, entendiéndose como tal aquella condición individual que aumenta la probabilidad de desarrollar una enfermedad cardiovascular.

En España estos dos FRCV son los más frecuentes detectados en atención primaria y, según datos de la Sociedad Española de Hipertensión Arterial, aproximadamente un 35% de la población adulta española (mayores de 18 años) padece hipertensión (llega al 40% en edades medias, y al 68% en los mayores de 60 años), afectando a unos 10 millones de sujetos adultos (Banegas et al., 2009). A nivel mundial, en el año 2000 la prevalencia aproximada de HTA en personas de más de 20 años fue del 26,4%, equivalente a 972 millones de personas y la estimación para el año 2025 es de 29,2% (Kearney et al., 2005).

## 4 Objetivos

A principios de los años noventa del siglo pasado, en los estudios en la población española entre 35 y 65 años de edad, se evidenció que el 18,6% de los varones y el 17,6% de las mujeres tenían valores de colesterol igual o superior a 250 mg/dL y, cuando el límite era  $\geq$  de 200 mg/dL, el porcentaje aumentó hasta el 56,7% y el 58,6%, respectivamente (Villar et al., 2003). Estas cifras se han incrementado en años posteriores (Villar et al., 2007), hasta tal punto que las concentraciones séricas de colesterol y cLDL de la población española son similares a las de otros países de nuestro entorno (Tolonen et al., 2005).

Debido a la escasa sintomatología, tanto la HTA como la hipercolesterolemia pueden permanecer silentes durante largos periodos de tiempo, de ahí la importancia de su control en la prevención de las distintas ECV.

Teniendo en cuenta esta situación y el hecho de que una de las líneas de investigación que se viene desarrollando en el laboratorio de Farmacognosia y Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca se centra en el estudio de tratamientos antihipertensivos, surgió el proyecto del estudio con pravastatina, la única estatina hidrosoluble disponible y que fue autorizada en España en 1991.

Las estatinas están recibiendo en el momento actual una atención especial porque, además de ser los fármacos más usados en la terapia de las dislipidemias gracias a su poderoso efecto hipolipemiante, lo cual favorece una reducción de la mortalidad cardiovascular, muestran efectos no relacionados con la reducción del colesterol (efectos pleiotrópicos) que podrían contribuir a sus efectos beneficiosos. Por ello, el objetivo fundamental que nos planteamos fue estudiar los efectos de pravastatina sobre diferentes parámetros cardiovasculares independientemente de sus propiedades hipocolesterolemiantes, para lo cual utilizamos como animales de experimentación ratas normotensas e hipertensas, pero sin hipercolesterolemia, con las que se llevaron a cabo tanto los estudios *in vivo* como *in vitro*. Además, gracias a la colaboración con el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, pudieron llevarse a cabo algunos ensayos en arterias humanas.

Los objetivos planteados en este trabajo fueron:

- 1.- Estudiar los efectos del tratamiento crónico con pravastatina sobre la presión arterial en ratas, con hipertensión incipiente (ratas genéticamente hipertensas, SHR de 8 semanas), con hipertensión claramente establecida (SHR de 24 semanas), y en ratas normotensas (ratas wistar Kyoto, WKY).
- 2.- Investigar el efecto del tratamiento crónico con pravastatina sobre la reactividad vascular y el remodelado cardiovascular ocasionado por el proceso hipertensivo.
- 3.- Estudiar el efecto de pravastatina sobre la disfunción endotelial y el estrés oxidativo en arterias aisladas de rata.
- 4.- Investigar si pravastatina modifica la reactividad vascular de arterias humanas procedentes de pacientes sometidos a cirugía de revascularización aorto coronaria (*bypass*).

## 6 Objetivos

*INTRODUCCIÓN*

## 8 Introducción

## **1.- ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y FACTORES DE RIESGO**

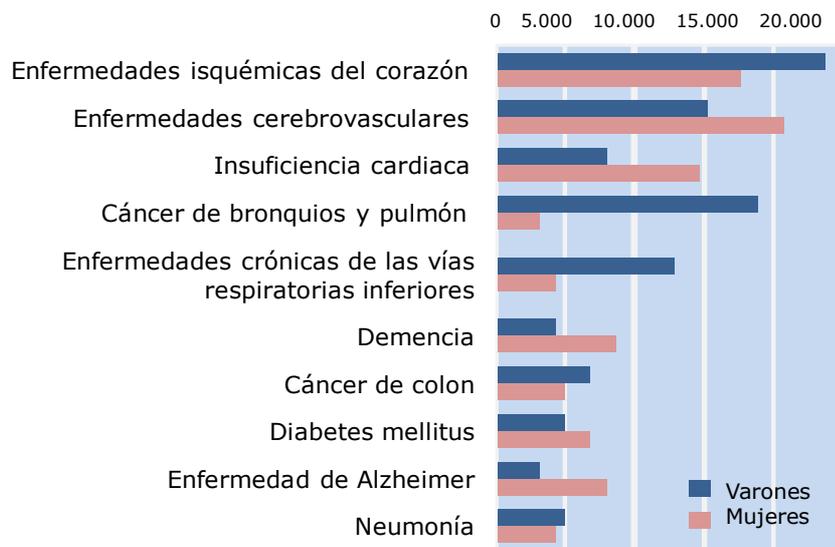
Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2005 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas en el mundo; 7,6 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria y 5,7 millones a los accidentes cerebrovasculares (OMS, 2009).

Aunque la mortalidad cardiovascular global ha disminuido en las últimas décadas, principalmente a expensas de la reducción de la incidencia de accidentes cerebrovasculares, la de origen coronario persiste prácticamente igual y aumenta progresivamente la debida a la insuficiencia cardiaca congestiva (OMS, 2009).

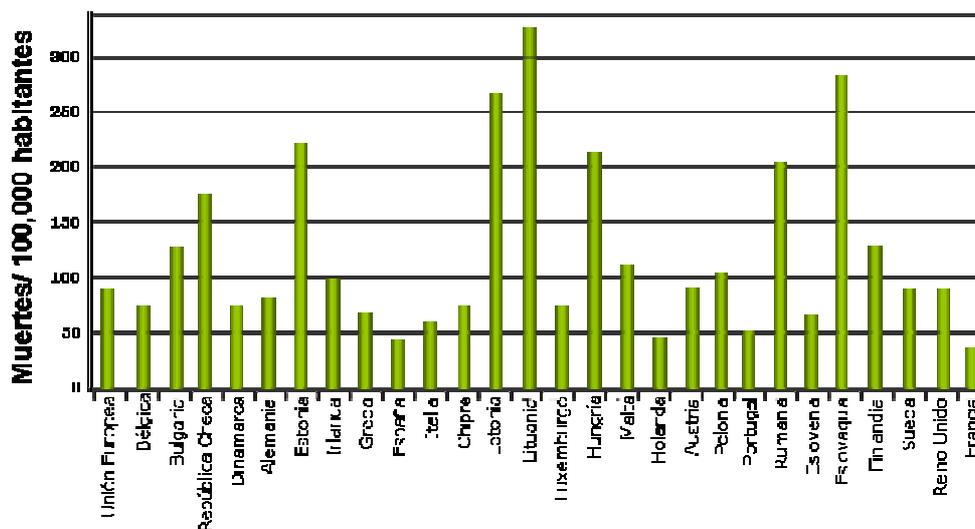
En España, los últimos datos del I.N.E en 2009 sobre la estadística de defunciones según la causa de muerte referidos a 2007 (I.N.E., 2009) muestran que las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer puesto como causa de muerte (con un total de 124.126 defunciones, lo que supone el 32,2%), seguidas de los tumores (26,8%) y las enfermedades del sistema respiratorio (11,4%).

A nivel más detallado, el patrón de mortalidad de 2007 fue similar al del año anterior, las enfermedades isquémicas del corazón (infarto, angina de pecho) y las cerebrovasculares continuaron ocupando el primer y segundo lugar, respectivamente, en número de muertes. Por su parte, la insuficiencia cardiaca superó al cáncer de bronquios y pulmón como la tercera causa que originó más defunciones (Figura 1).

Si comparamos con nuestro entorno europeo, España está por debajo de la media de la Unión Europea en defunciones debidas a enfermedades isquémicas del corazón (Figura 2).



**Figura 1.-** Defunciones en España en 2007 según la causa de muerte (tomada del Boletín informativo de I.N.E., 2009).



**Figura 2.-** Defunciones debidas a enfermedades isquémicas del corazón en hombres y mujeres de diferentes países europeos (tomada de Eurostat, 2009).

Datos del 2008 a excepción de Polonia, Italia, Rumanía, Malta, Reino Unido, Slovenia, Bulgaria (2007), Dinamarca, Luxemburgo, Portugal (2006) y Bélgica (2004).

El conocimiento de los principales FRCV es fundamental a la hora de instaurar una prevención más eficiente y reducir la incidencia de ECV. Predecir las posibilidades que tiene una persona de padecer un evento cardiovascular es un reto médico que hasta ahora no ha sido solventado de forma completa (Masana, 2004). El estudio de FRAMINGHAM, iniciado en 1948, quizás sea el estudio epidemiológico más importante que se ha realizado sobre ECV y los factores de riesgo asociados a ellas. Desde la primera publicación basada en este estudio en 1951 hasta hoy el número de artículos publicados y referencias en internet que hacen alusión a éste no han dejado de aumentar ([www.framinghamheartstudy.org](http://www.framinghamheartstudy.org)).

Este estudio ha sido de gran ayuda para la identificación de los FRCV más importantes como la hipertensión, hipercolesterolemia, tabaco, diabetes mellitus, etc. y ha aportado información valiosa sobre otros factores relacionados con la edad, sexo, disminución de HDL-colesterol, o ciertos factores relacionados con el entorno. En base a los factores de riesgo más importantes se puede calcular la probabilidad que tiene una persona de sufrir un problema cardiovascular.

Los datos del estudio de FRAMINGHAM pueden sobreestimar el riesgo coronario en países como España con una baja incidencia de mortalidad por enfermedad coronaria (Figura 2), por lo que la publicación de los resultados del proyecto SCORE (Ridker et al., 2007) sobre mortalidad cardiovascular a los 10 años, ha permitido elaborar unas tablas basadas en datos europeos, que son precisamente las que el Comité Español Interdisciplinario para la prevención cardiovascular aconseja utilizar, si bien menciona otras alternativas como son las tablas calibradas de FRAMINGHAM, en función de los resultados que vayan apareciendo en el futuro.

La investigación sobre el papel de los FRCV tanto nuevos como algunos ya mencionados continúa. En este sentido los resultados del estudio INTERHEART (Yusuf et al., 2004) son interesantes, en especial en lo que se refiere a los factores psicosociales. Este estudio permitió definir 9 variables a las que atribuir el 90% del riesgo de presentar un infarto de miocardio. La hipertensión arterial, la diabetes, la dislipidemia, el tabaquismo, la obesidad y el estrés fueron los factores de riesgo, mientras que la ingesta de fruta y verdura, la actividad física e incluso el consumo

## 12 Introducción

moderado de alcohol, eran factores protectores. No obstante, otros factores de riesgo cardiovascular enmarcados en el grupo de predisponentes y acompañantes (malnutrición, niveles elevados de homocisteína, fibrinógeno, proteína C reactiva, etc.) van adquiriendo progresivamente mayor importancia.

En la última década se han definido nuevos parámetros clínicos y bioquímicos asociados con inflamación y trombogenicidad, que tienen relación con el riesgo vascular. Sin embargo, cuando estos parámetros se utilizan para mejorar la predicción de eventos cardiovasculares basados en los factores cardiovasculares mayores, no aportan una mejoría significativa. Así, en un estudio reciente (Wang et al., 2006), la incorporación de hasta diez parámetros bioquímicos a los factores cardiovasculares mayores para calcular el riesgo cardiovascular no mejoró la predicción basada solamente en éstos últimos.

Un meta-análisis de 48 estudios transversales, realizados en España entre 1990 y 2003, analiza la prevalencia de los diferentes FRCV en la población española (Medrano et al., 2005). Del estudio destacan una serie de datos reflejados en la tabla 1. Un elemento común de estos factores de riesgo es la **disfunción endotelial**, la cual si no se corrige terminará en daño vascular.

	<b>% Total</b>	<b>% Hombres</b>	<b>% Mujeres</b>
<b>HTA</b>	33,9	34,8	33,0
<b>Tabaquismo</b>	32,7	41,1	24,3
<b>Hipercolesterolemia</b>	21,9	20,9	22,8
<b>Obesidad</b>	20,6	17,9	23,2
<b>Diabetes</b>	10,1	11,7	8,4

**Tabla 1.-** Factores de riesgo cardiovascular en la población española.

En atención primaria la HTA y las hiperlipidemias son los FRCV más frecuentes. Estos suelen tener un deficiente control pues, debido a su escasa sintomatología, permanecen silentes durante largos periodos de tiempo. Por ello el adecuado control tanto de los niveles de presión arterial como de los niveles de lípidos plasmáticos son fundamentales en la prevención de las distintas ECV.

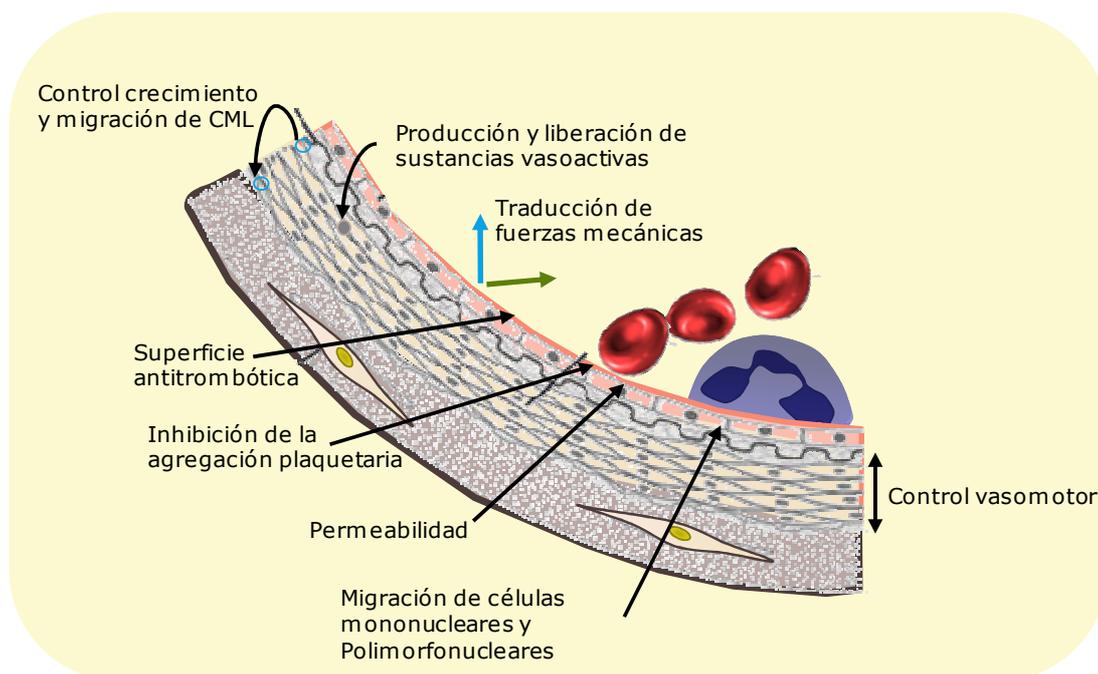
Además, en la población española también está aumentando la prevalencia de la diabetes, que ha pasado de un 5,6% a un 6,1% en 5 años según las encuestas nacionales de salud en España de los años 2001 y 2006 ([www.msc.es](http://www.msc.es)). Pero las cifras oficiales están infravaloradas debido a que, al igual que la HTA y las hiperlipidemias, cifras de glucosa por encima de 126 mg/dL, consideradas como hiperglucemia, no dan lugar a síntomas durante mucho tiempo, por lo que se estima que realmente otro 2,5% de la población desconoce que la padece ([www.sanidad.jcyl.es](http://www.sanidad.jcyl.es)).

La modificación de los factores de riesgo pueden reducir los episodios cardiovasculares y la muerte prematura tanto en las personas con ECV establecidas como en aquellas con alto riesgo, debido a uno o más FRCV, por ello son muchos los esfuerzos que se están llevado a cabo en este sentido por diferentes organismos públicos y se han convertido en una prioridad de política sanitaria por sus repercusiones económicas y sociales.

## 2.- DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

Actualmente el endotelio se considera el principal órgano de regulación vascular con acción paracrina, autocrina y endocrina que está implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes (Feletou y Vanhoutte, 2006). Para que el endotelio pueda ejercer todas estas funciones es necesaria la integridad anatómica y funcional del mismo.

El endotelio vascular está situado en una posición anatómica estratégica entre la sangre y la pared vascular que le permite actuar como receptor y transmisor de señales entre la sangre y el músculo liso vascular. Las células endoteliales son capaces de detectar variaciones de tipo mecánico, como cambios hemodinámicos de la presión o las fuerzas de cizallamiento de la sangre, químico como la presión de oxígeno, humorales como las modificaciones de los factores circulantes o locales y cambios en sus interacciones con las plaquetas o los leucocitos. El endotelio va a traducir dichas modificaciones respondiendo a ellas mediante la síntesis y liberación de numerosos factores biológicamente activos que van a regular la angiogénesis, las respuestas inflamatorias, la hemostasis, así como el tono y la permeabilidad vascular (Feletou y Vanhoutte, 2006) (Figura 3). Cuando la capacidad reguladora del endotelio se altera y se producen procesos como la agregación plaquetaria, trombosis, inflamación, vasoconstricción o el incremento de la permeabilidad vascular, hablamos de **disfunción endotelial**. Ésta puede definirse no sólo por el desequilibrio entre la síntesis, liberación o efecto de los factores endoteliales vasodilatadores y de los agentes vasoconstrictores que pueden sintetizarse en las células de este tejido, sino también por una alteración del estado redox en el que las sustancias pro-oxidantes sobrepasan la capacidad antioxidante del organismo.



**Figura 3.-** Funciones biológicas del endotelio vascular.

### 2.1.- Factores vasodilatadores derivados del endotelio

En la actualidad, el término genérico de factor relajante derivado de endotelio (EDRF) se asocia de forma general a los mediadores relajantes liberados por las células endoteliales, y no a uno en particular como se ha considerado históricamente al óxido nítrico (NO). Así, hay también que considerar derivados prostanoideos como la prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), cuya naturaleza es en la actualidad objeto de estudio (Figura 4).

**Óxido nítrico:** es una molécula pequeña de naturaleza gaseosa que actúa como mediador de numerosos procesos biológicos. Se produce a partir del grupo guanidino de la L-arginina, siendo el otro coproducto de esta reacción biológica la L-citrulina. El NO se sintetiza por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Moncada et al., 1991), hemoproteína que además del sustrato requiere oxígeno molecular, la presencia de calmodulina y cuatro cofactores: nicotinamida adenín dinucleótido

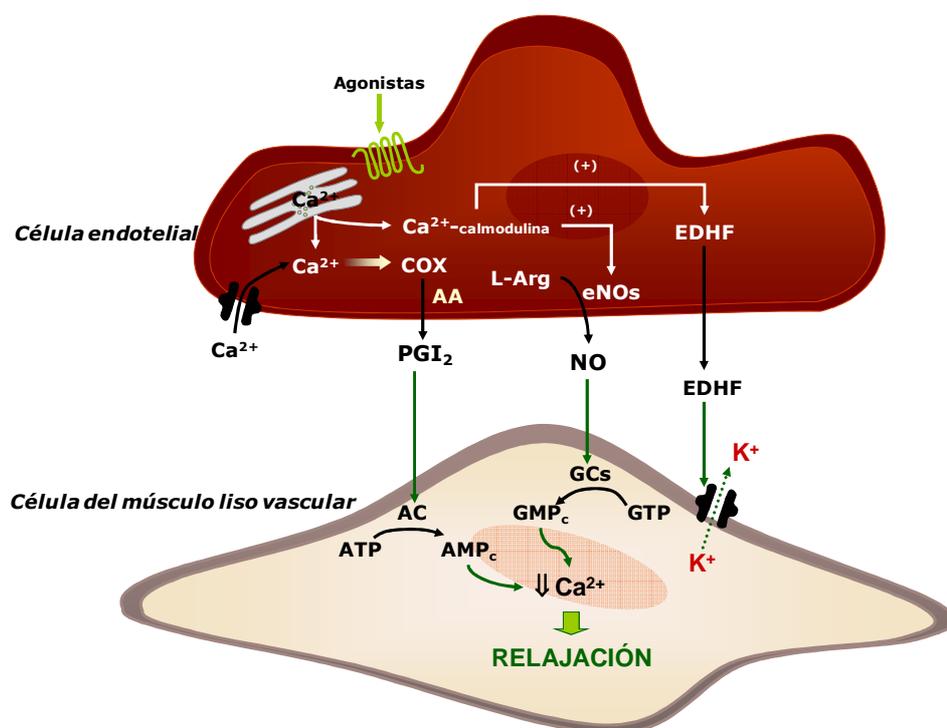
## 16 Introducción

fosfato forma reducida (NADPH), flavín adenín dinucleótido, flavín mononucleótido forma oxidada y tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Stuehr, 1997).

En el hombre se han identificado tres isoformas de la NOS presentes en diferentes tipos celulares: endotelial (eNOS), presente principalmente en las células endoteliales; inducible (iNOS), presente en macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas (CML) y células mesangiales y neuronal (nNOS) presente en el tejido nervioso. Las isoformas eNOS y nNOS se expresan constitutivamente mientras que la iNOS requiere, en la mayoría de los casos, la presencia de un estímulo inflamatorio extracelular específico para su expresión y, en contraste con eNOS y nNOS, no necesita un aumento de la concentración intracelular de calcio para ser biológicamente activa. Las enzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO que participan en procesos fisiológicos o reguladores mientras que la actividad iNOS es aproximadamente 1000 veces mayor y el NO formado participa en procesos inmunes o de lesión celular (Moncada et al., 1991).

En la membrana plasmática la eNOS se encuentra unida a unas proteínas llamadas caveolinas y esta unión la mantiene en forma inactiva. Cuando un agonista como la acetilcolina (ACh) actúa sobre su receptor en el endotelio aumenta el Ca<sup>2+</sup> intracelular, se forma el complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina que al unirse a la eNOS la libera de su unión a la caveolina activándola. El NO sintetizado difunde a las CML donde activa la guanilato ciclasa soluble (GCs), se incrementan los niveles de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) y se produce la relajación vascular por diversos mecanismos (Marín y Rodríguez, 1997). El NO se libera de las células endoteliales en respuesta a numerosos factores tanto físicos (rozamiento de la sangre, fuerza de cizallamiento) (Rubanyi et al., 1986) como de tipo humoral (Furchgott y Vanhoutte, 1989) y actúa como mediador local de los llamados vasodilatadores endotelio-dependientes, como la ACh y la bradicinina (BK), o como mediador de la acción vasodilatadora producida en procesos inflamatorios en respuesta a la histamina o la BK. La liberación de NO en respuesta a ciertas hormonas como la vasopresina y las catecolaminas es responsable de la vasodilatación inducida por estas hormonas sobre zonas vasculares específicas, o modula la acción constrictora generalizada de éstas.

El NO participa, junto con la  $\text{PGI}_2$ , en el mantenimiento de la permeabilidad vascular modulando la agregación plaquetaria. Productos derivados de los procesos de coagulación y agregación plaquetaria, como el adenosín difosfato, la trombina, la serotonina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), producen liberación de NO, lo que explica por qué la presencia de endotelio vascular supone una protección contra la agregación y formación de trombos (Cohen et al., 1983). Además, el NO es capaz de inhibir la proliferación y crecimiento de las células del músculo liso (CML) (Garg y Hassid, 1989).



**Figura 4.-** Liberación de factores relajantes desde las células endoteliales y su efecto sobre las células del músculo liso vascular.

**Prostaciclina:**  $\text{PGI}_2$  se sintetiza a partir del ácido araquidónico por acción de la enzima ciclooxygenasa (COX). Se sintetiza mayoritariamente en las células

## 18 Introducción

endoteliales pero también en la media y en la adventicia en respuesta al cizallamiento, hipoxia y distintos mediadores. Su liberación depende principalmente de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares (Parsaee et al., 1992).

Presenta propiedades vasodilatadoras y antiagregantes plaquetarias al activar la adenilato ciclasa e incrementar la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en las células musculares lisas y en plaquetas. Además actúa regulando la producción de endotelina (ET-1) (Lüscher et al., 1993). La  $\text{PGI}_2$  se libera junto con el NO como respuesta a la estimulación de las células endoteliales por agonistas como BK, ACh y trifosfato de adenosina (ATP) (Busse et al., 1984). Parece ser que la  $\text{PGI}_2$  juega un papel modulador del tono vascular, oponiéndose a la acción vasoconstrictora de otros derivados del ácido araquidónico.

**Factor hiperpolarizante derivado del endotelio:** diversos estudios han puesto de manifiesto la persistencia de relajación a la ACh estando inhibida la formación de  $\text{PGI}_2$  y de NO, confirmando la existencia de un tercer factor relajante endotelial (Rubanyi y Vanhoutte, 1987). Este factor produce hiperpolarización de las células del músculo liso, de donde deriva su nombre (Chen et al., 1988; Suzuki, 1988).

Se han propuesto diversas sustancias que podrían actuar como EDHF, entre ellas, los ácidos epoxieicosatrienoicos (Popp et al., 2002), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Matoba et al., 2002), la anandamida (Randall et al., 1996) o el péptido natriurético tipo C (Chauhan et al., 2003). En cualquier caso las respuestas mediadas por el EDHF se inician con un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la subsiguiente activación de canales de  $\text{K}^+$ , que da lugar a la hiperpolarización de las células. Hay autores que implican en estas respuestas del EDHF a las uniones que permiten la comunicación entre células (*gap junctions*) (Busse et al., 2002; Griffith et al., 2002).

Se ha demostrado la participación conjunta del NO y del EDHF en la relajación dependiente del endotelio en distintos tipos de arterias (Nakashima et al., 1993; Petersson et al., 1995). Además, parece que la participación del EDHF en la relajación endotelio-dependiente es mayor a medida que disminuye el tamaño del vaso (Urakami et al., 1997). Así, mientras que en arteria aorta el principal responsable de la relajación es el NO, en pequeñas arterias como mesentéricas o

cerebrales juega un papel importante el EDHF. Es posible que en circunstancias normales el NO y el EDHF actúen sinérgicamente, de forma que cada factor potencie los efectos del otro (Wallerstedt et al., 1997), sin embargo, también se ha descrito que la síntesis de NO inhibe la actividad vascular del EDHF, por lo que es posible que en diversas patologías en las que la síntesis de NO esté disminuida, la producción y los efectos del EDHF puedan incrementarse para paliar, en parte, la carencia de NO (Nishikawa et al., 2000). En estos casos el EDHF contribuiría en mayor medida a mantener la relajación dependiente del endotelio, adquiriendo más importancia en la homeostasia vascular.

## 2.2.- Factores contracturantes derivados del endotelio

El tono aumentado en los vasos se puede producir por una liberación reducida, por las células endoteliales, de factores relajantes, en particular NO, o por producción de sustancias vasoconstrictoras (Vanhoutte, 1993) (Figura 5). Entre estos factores se encuentran el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que actúa como secuestradores de NO (Rubanyi y Vanhoutte, 1986a) y los derivados de la COX, como el endoperóxido cíclico ( $PGH_2$ ) y el tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ). Por último, se encuentra el péptido ET, que juega un papel más importante en la regulación del tono vascular a largo plazo, que en cambios inmediatos en el grado de contracción (Schini y Vanhoutte, 1991; Masaki et al., 1992).

**Endotelina:** en 1988, Yanagisawa y cols. aislaron, a partir de un medio de cultivo de células endoteliales de aorta porcina, un péptido de 21 aminoácidos a que llamaron ET, el cual se ha mostrado como el más potente vasoconstrictor endógeno *in vivo* e *in vitro* conocido hasta ahora. Es diez veces más potente que la angiotensina (Ang II), vasopresina y neuropéptido Y. El término endotelinas se refiere a la familia de isopéptidos definida como ET-1, ET-2 y ET-3, que se diferencian en su secuencia de aminoácidos. Las tres tienen actividad vasoconstrictora, siendo la ET-2 la de mayor potencia (Jimenez et al., 1997a). La producción de endotelinas está primariamente regulada a nivel transcripcional, puede estar influenciada por sustancias vasoactivas como Ang II, vasopresina, noradrenalina y trombina o por factores de crecimiento, citoquinas, estrés e hipoxia (Jimenez et al., 1997b). Estos

## 20 Introducción

péptidos derivan de precursores con un número importante de aminoácidos, denominados preproendotelinas (203 a 212 aminoácidos), que se transformarán posteriormente en endotelinas grandes (38 a 41 aminoácidos). La proteólisis de las endotelinas grandes a endotelinas pequeñas, por el enzima convertidor de la endotelina, es un paso necesario para que estos péptidos se transformen en moléculas biológicamente activas de 21 aminoácidos.

En mamíferos se han identificado dos subtipos de receptores de las endotelinas denominados tipo A (ET<sub>A</sub>) y tipo B (ET<sub>B</sub>). El receptor ET<sub>A</sub> es altamente específico para la ET-1 y está ampliamente distribuido en las células musculares lisas vasculares (CMLV). La unión de ET-1 al receptor ET<sub>A</sub> produce la mayoría de los efectos vasoconstrictores de este péptido. A diferencia del receptor ET<sub>A</sub>, los receptores ET<sub>B</sub> se encuentran principalmente en las células endoteliales donde inducen la liberación de NO y PGI<sub>2</sub>, produciendo relajación vascular que podría modular su acción vasoconstrictora (Masaki, 1995).

Las diversas acciones vasculares de las endotelinas incluyen: vasoconstricción potente y aumento de las resistencias vasculares, efectos presores, regulación del tono de los vasos linfáticos, aumento de la permeabilidad vascular produciendo edema intersticial. Éste último efecto estaría parcialmente mediado o modulado por la liberación de TXA<sub>2</sub> (Sirois et al., 1992; Zaugg et al., 1996). Están implicadas, también, en un aumento del hematocrito, ya que al producir vasoconstricción se produce una disminución del volumen plasmático y una hemoconcentración (López-Farré et al., 1989). Entre las acciones no vasculares destacan: la activación de la mitogénesis de CMLV, fibroblastos, melanocitos, capilares cerebrales y células estrelladas hepáticas.

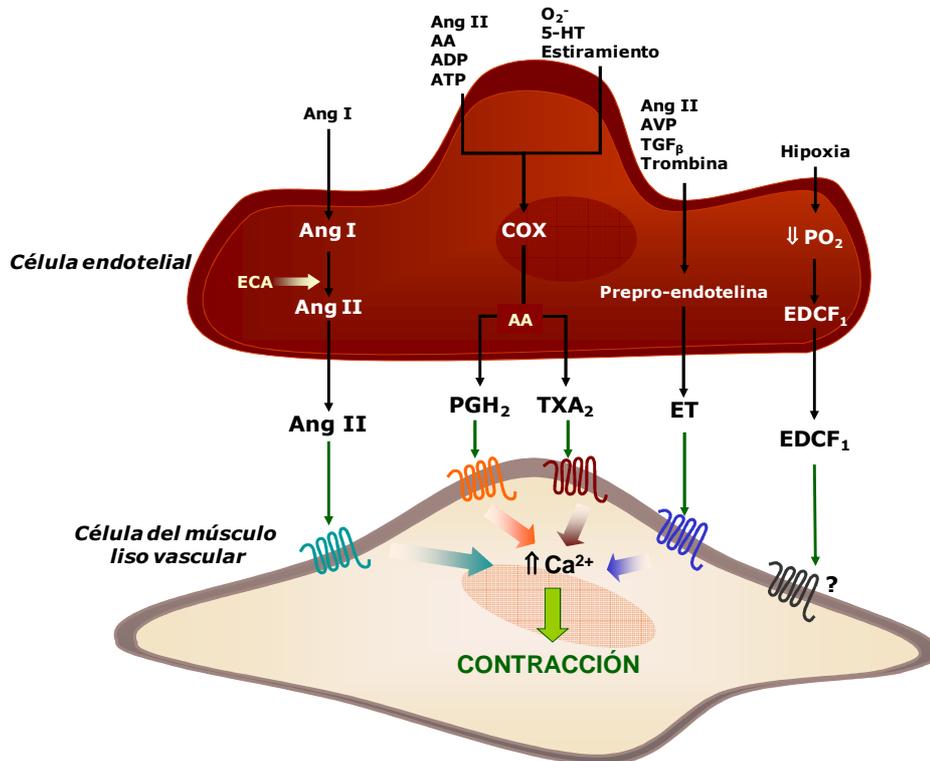
**Factores derivados de ciclooxigenasa:** la COX es una proteína integrante de las membranas microsomales y de la membrana nuclear, que participa de forma activa en la síntesis de prostaglandinas. Las prostaglandinas de los mamíferos derivan del ácido araquidónico producido por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de membrana.

La COX favorece la oxidación del ácido araquidónico formando un endoperóxido cíclico, la prostaglandina G<sub>2</sub>, del que deriva otro endoperóxido, la

PGH<sub>2</sub>. Éste, por acción de la prostaciclina sintetasa, se transforma en PGI<sub>2</sub>, que es un poderoso antiagregante y vasodilatador y por acción de la tromboxano sintetasa en TXA<sub>2</sub>, que es un poderoso agregante plaquetario y vasoconstrictor. Finalmente, la PGH<sub>2</sub> por la acción de diferentes prostaglandinas sintetetas da origen a las PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> respectivamente (Samuelsson et al., 1978).

Inicialmente se pensó que sólo había una COX (COX-1), pero Needleman (1997) caracterizó una segunda isoforma que denominó COX-2. La COX-1 es una enzima constitutiva con actividad permanente en todas las células del organismo, salvo en los hematíes. La COX-1 es la responsable de la producción continua de PGI<sub>2</sub> que mantiene la integridad vascular, muy especialmente en la mucosa del tracto digestivo y es un poderoso antiagregante plaquetario. La COX-2 es una enzima inducida por estímulos inflamatorios.

En algunos lechos vasculares, la contracción dependiente del endotelio puede producirse por el ácido araquidónico y prevenirse por inhibidores de la COX como la indometacina. Estos datos apoyan el concepto de la existencia de mediadores endoteliales vasoconstrictores procedentes del metabolismo del ácido araquidónico, como el TXA<sub>2</sub>, la PGH<sub>2</sub> o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Luscher et al., 1992). La producción de metabolitos derivados de la COX se ha estudiado en numerosos modelos experimentales. En arterias de ratas SHR y en animales diabéticos se ha demostrado que la estimulación de receptores muscarínicos en el endotelio con ACh provoca un incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> a nivel intracelular que tiene dos consecuencias: primero, la actividad de la eNOS se incrementa y el NO formado difunde a las CMLV subyacentes y segundo, se estimula la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de fuentes no identificadas. Dependiendo de la cantidad de NO que reaccione con O<sub>2</sub><sup>-</sup> una mayor o menor cantidad de O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede difundir fuera de la célula endotelial. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> intracelular, aunque también el extracelular, estimulan a la COX-1 para transformar el ácido araquidónico en endoperóxidos que difunden hacia las CMLV provocando contracción (Rubanyi y Vanhoutte, 1986b).



**Figura 5.-** Factores contracturantes derivados del endotelio y su efecto sobre las células del músculo liso vascular.

### 2.3.- Estrés oxidativo

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater, 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, muchas derivadas del oxígeno, no causan daño oxidativo en condiciones normales, debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes, osea la tasa de

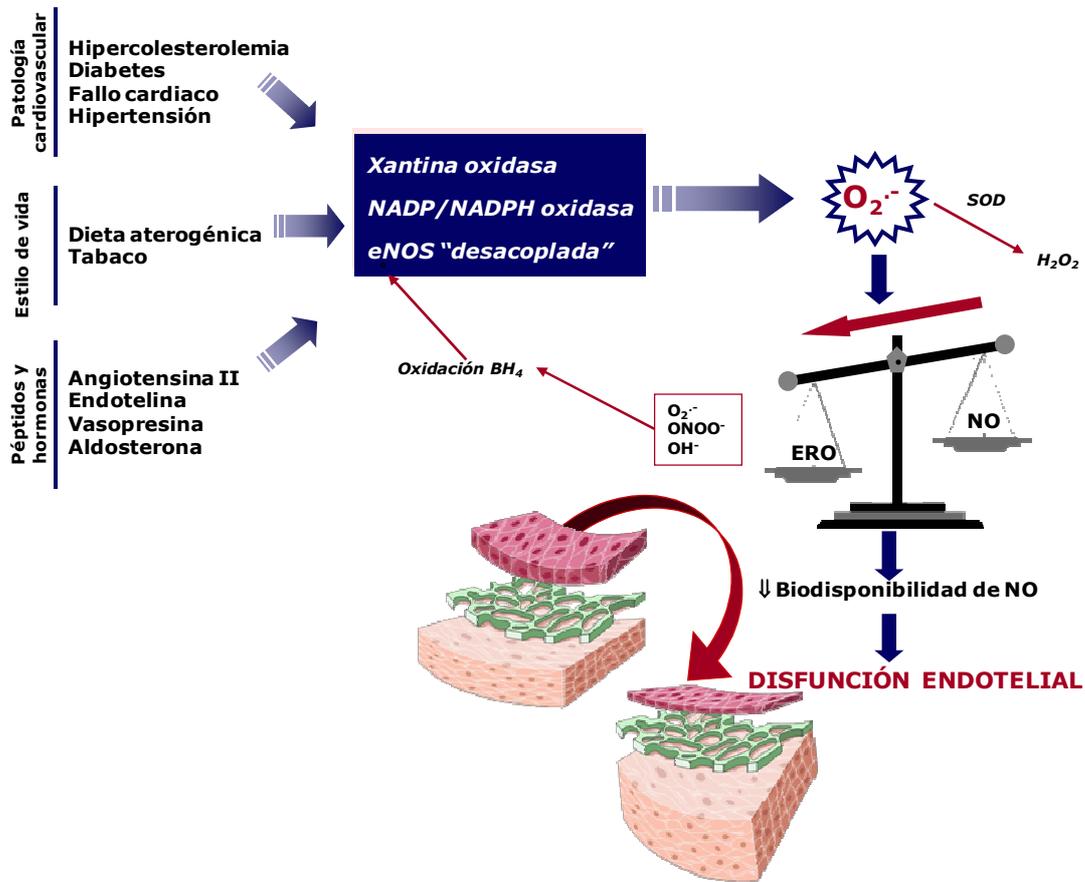
formación de agentes oxidantes está equilibrada con la tasa de eliminación (Ogita y Liao, 2004; Paravicini y Touyz, 2006).

En la disfunción endotelial se produce un desequilibrio en el estado redox en el que las sustancias pro-oxidantes sobrepasan la capacidad antioxidante del organismo, lo que da lugar a un incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO). A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas ERO en el sistema vascular, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas que pueden afectar a diversas moléculas, alterando sus funciones fisiológicas y contribuyendo al desarrollo de diversas enfermedades vasculares.

Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias pro-oxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez. Muchas situaciones patológicas como la hipercolesterolemia, la diabetes y la hipertensión, patologías asociadas a la disfunción endotelial, incrementan las ERO en la pared de los vasos (Figura 6).

La ERO más importante en la pared vascular es el  $O_2^{\cdot-}$  que puede inactivar el NO y así alterar la relajación. La dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  por la superóxido dismutasa (SOD) produce  $H_2O_2$ , una ERO más estable que participa en procesos inflamatorios y proliferativos en la células vasculares. Por otra parte los  $O_2^{\cdot-}$  pueden combinarse con NO para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), una molécula que por su fuerte capacidad oxidante sobre proteínas, lípidos o incluso ácidos nucleicos causa daño celular (Beckman y Koppenol, 1996). El  $O_2^{\cdot-}$  puede inducir vasoconstricción, hipertrofia vascular y miocárdica (de Andrade et al., 2002, Fortuño et al., 2005), disminución de la función renal (Sedeek et al., 2003) e incrementar la actividad simpática del sistema nervioso central (Zanzinger, 2002).

Hay múltiples fuentes celulares de formación de ERO y diferentes enzimas que las producen en función de diversas circunstancias. Además de la cadena respiratoria en las mitocondrias, los radicales  $O_2^{\cdot-}$  pueden producirse por la COX y lipoxigenasa, el citocromo  $P_{450}$ , la xantina-oxidasa (XO), la eNOS desacoplada y la NADPH-oxidasa. Las tres últimas son las principales responsables de la producción de estos radicales tanto en el endotelio como en las CMLV (Cai y Harrison, 2000, Guzik y Harrison, 2006) (Figura 6).



**Figura 6.-** Mecanismos causantes de la disfunción endotelial inducida por estrés oxidativo en las enfermedades cardiovasculares.

**NADPH-oxidasa:** consta de varios componentes, entre los cuales al menos existen dos proteínas de membrana y tres proteínas citosólicas (Dahlgren et al., 1999). El componente de membrana es un heterodímero formado por la proteína gp91<sup>phox</sup> y la proteína p22<sup>phox</sup>; ambas proteínas forman un complejo con flavin adenin dinucleótido (FAD) dando lugar al denominado citocromo b558. Por otra parte, el componente citoplasmático está formado por tres proteínas independientes denominadas p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>. Además participa otra proteína de unión de nucleótidos de guanina, la GTPasa Rac (Brandes y Kreuzer, 2005). En células en

reposito, la oxidasa está inactiva y sus componentes permanecen separados entre la membrana y el citosol. Cuando se exponen a estímulos apropiados la NADPH-oxidasa se activa por asociación de estos componentes en la membrana plasmática produciendo  $O_2^-$  (Figura 7).

La actividad y la expresión de la NADPH-oxidasa está regulada por citocinas, hormonas y factores físicos tradicionalmente implicados en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Bedard y Krause, 2007). En particular, la Ang II es un importante activador de la NADPH-oxidasa vascular. En las células del músculo liso vascular, la activación del receptor  $AT_1$  de Ang II determina la fosforilación de residuos de serina en  $p47^{phox}$ . Además de activar la NADPH-oxidasa, la Ang II induce también un aumento en la expresión de sus subunidades, tanto en células endoteliales como musculares. Así, mediante la infusión continua de Ang II en ratas, se observa cómo la producción vascular de  $O_2^-$  y la actividad de la NADPH-oxidasa se ven notablemente incrementadas (Rajagopalan et al., 1996).

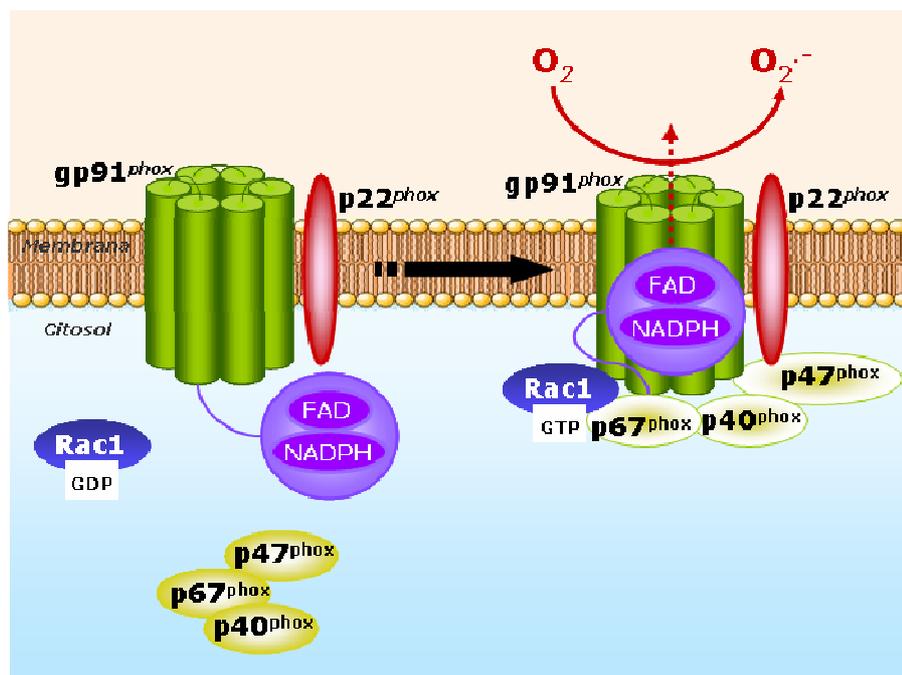
La activación de esta enzima produce gran cantidad de señales intracelulares que pueden desembocar en disfunción endotelial, proliferación de las CMLV, expresión de genes pro-inflamatorios y síntesis de la matriz extracelular (Viridis et al., 2004).

**Xantina Oxidasa:** es una óxido-reductasa que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina durante el metabolismo de las purinas. Puede existir en dos formas, como xantina-deshidrogenasa que puede convertirse fácilmente, por oxidación de residuos sulfhidrilo o por proteólisis, en la forma xantina-oxidasa. Esta última reduce el oxígeno molecular para formar radicales  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ .

**eNOS desacoplada:** la eNOS puede generar  $O_2^-$  en lugar de NO cuando hay deficiencias en la concentración de su sustrato, L-arginina, o de su cofactor,  $BH_4$ . Este cofactor es fundamental para la actividad de la eNOS pues estabiliza la enzima en su forma dimérica y participa en los procesos de transferencia de electrones durante los procesos catalíticos. Su ausencia produce cambios en la eNOS, se altera su estructura como dímero y se favorece la generación de  $O_2^-$  (Wever et al, 1997).

## 26 Introducción

Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y, por tanto, pueden iniciar reacciones tóxicas en la misma. Estas reacciones alteran las propiedades de las membranas de tal modo que cambian su fluidez, aumentan la permeabilidad, disminuyen el potencial de membrana, hacen perder las funciones secretoras e inhiben los procesos metabólicos celulares. Los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana y las proteínas transmembrana que tienen aminoácidos oxidables son susceptibles de alterarse por los radicales libres generando productos secundarios incluyendo aldehídos, como el malondealdehído (MDA), cetonas, etc. El MDA presenta una elevada capacidad de reaccionar con las bases de ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas que pueden estar implicadas en la patogenia de varias enfermedades (Freeman y Crapo, 1982; Spiteller, 2001).



**Figura 7.-** Representación esquemática de la NADPH-oxidasa en estado de reposo y activo.

## 2.4.- Disfunción endotelial en hipertensión arterial y aterosclerosis

Existen numerosos FRCV en los que la disfunción endotelial está presente, tanto factores bien caracterizados como las concentraciones altas de LDL, el tabaquismo, la diabetes y la HTA; como factores emergentes como la hiperhomocisteinemia, las infecciones, o el déficit estrogénico (Drexler, 1997). Cabe destacar que la disfunción endotelial no es homogénea en sus características y su distribución, varía en función de la patología asociada, así como con el lecho vascular que se considere (Puddu et al., 2000; Lahera et al., 2003; Feletou y Vanhoutte, 2006). Como hemos mencionado antes, la HTA y la hipercolesterolemia figuran entre los FRCV más frecuentes.

La disfunción endotelial asociada a la HTA humana se describió por primera vez en 1990 en los vasos del antebrazo (Panza et al., 1990) y la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio en la HTA se ha confirmado en numerosos estudios realizados en diferentes lechos vasculares (Park et al., 2001; Pompilio et al., 2001).

La HTA tiene una influencia directa en la función vascular, independientemente de otros FRCV. Ward y cols. (2004) estudiaron la presión arterial ambulatoria durante 24 horas y la función del músculo liso y del endotelio de arterias braquiales de pacientes hipertensos y normotensos y determinaron que estaba inversamente relacionada con la respuesta vasodilatadora mediada por flujo. Nishizaka y cols (2004) demostraron que la aldosterona puede causar disfunción endotelial en pacientes con HTA resistente independientemente de los valores de presión arterial. De hecho, la espironolactona aumentó la vasodilatación mediada por flujo a pesar de no reducir la presión arterial.

La HTA aumenta el trabajo que debe realizar el corazón por lo que éste tiene que aumentar su masa muscular (hipertrofia) para compensar; al principio resulta beneficioso, pero con el tiempo puede ocasionar insuficiencia coronaria y angina de pecho. Además, el aumento excesivo de su masa vuelve al músculo cardíaco rígido y, con frecuencia, se producen arritmias. La hipertrofia, la insuficiencia coronaria y las arritmias pueden hacer fracasar la función de bomba del corazón, con lo que hablaríamos de insuficiencia cardíaca.

## 28 Introducción

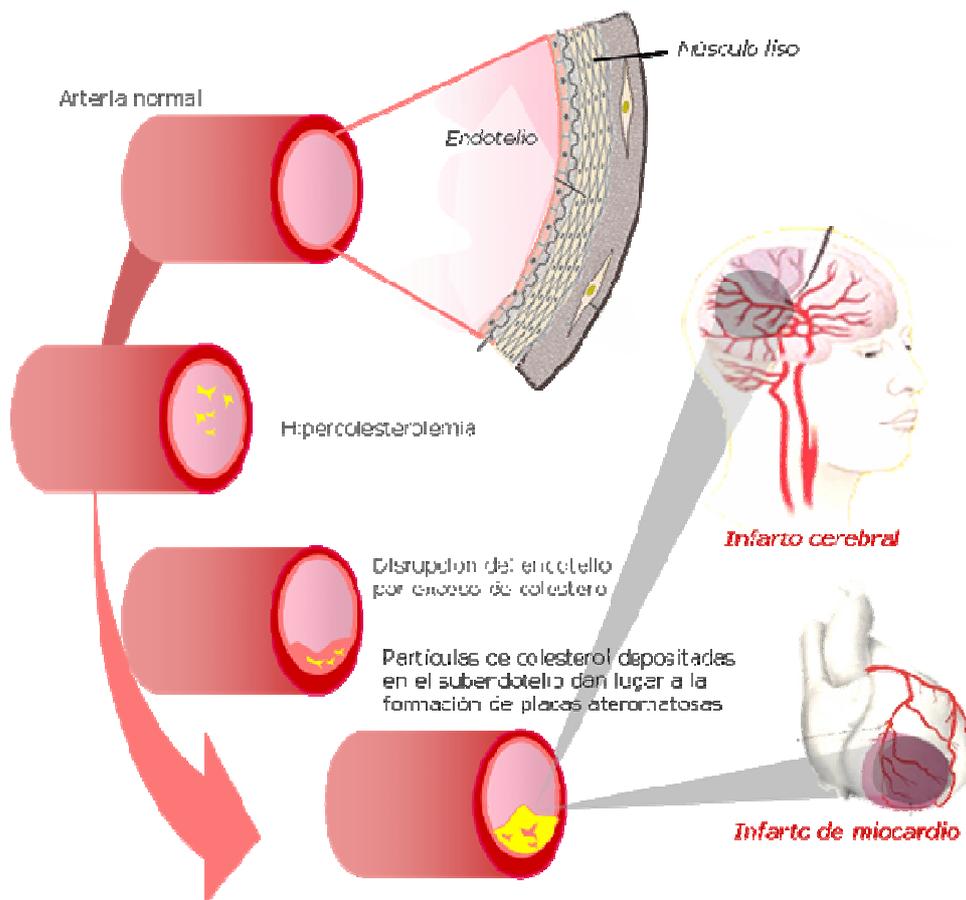
La HTA también afecta a las arterias dañando sus estructuras y facilitando la arteriosclerosis y la trombosis oclusiva. En otras ocasiones puede originar degeneración en las paredes de arterias importantes como la aorta, causando una dilatación localizada (aneurisma) que puede dar lugar a rotura brusca y provocar la muerte. En el cerebro, las arterias se pueden volver más rígidas y estrechas y, como consecuencia, el riego de las zonas que dependen de ellas es insuficiente, produciéndose el infarto. También puede ocurrir una hemorragia cerebral cuando las arterias lesionadas se rompen. En el riñón, las arterias se pueden dañar, causando falta de riego y conduciendo a una insuficiencia renal. A nivel periférico pueden ocasionar la denominada enfermedad arterial periférica que obliga a los pacientes a detener la marcha por el dolor.

Por otra parte, la disfunción endotelial es un evento importante y temprano en la patogénesis de la aterosclerosis, que contribuye a la iniciación y progresión de la placa aterosclerótica, lo cual se asocia a cambios bioquímico-morfológicos que gradualmente transforman la estructura de la pared arterial. Hay numerosos datos que apoyan la teoría que, en la evolución de la aterosclerosis se produce un proceso inflamatorio crónico arterial en el que están involucrados factores locales y generales (Ross, 1999a) de manera que los marcadores de actividad inflamatoria como la proteína C reactiva (PCR) son capaces de predecir el riesgo cardiovascular, incluso en personas aparentemente sanas (Woodward et al., 2003).

La aterosclerosis es una patología multifactorial, que se caracteriza por su progresión lenta y silenciosa, hasta alcanzar tal grado de severidad que desencadena un evento isquémico. Es la causa principal de infartos de miocardio y cerebrales, siendo responsable de la mayoría de las muertes por estas patologías. Las arterias afectadas por la aterosclerosis pierden su elasticidad y, a medida que los ateromas crecen, se hacen más estrechas. Además, con el tiempo los ateromas acumulan depósitos de calcio que pueden volverse frágiles y romperse, entonces, la sangre puede entrar, aumentando su tamaño y disminuyendo todavía más la luz arterial. Un ateroma roto puede derramar su contenido graso y desencadenar la formación de un coágulo sanguíneo (trombo) que estrecha aún más la arteria e incluso puede ocluirla o bien se desprende y pasa a la sangre hasta llegar a una arteria más pequeña, donde

causará una oclusión (embolia). La presión arterial alta, los niveles de colesterol y triglicéridos elevados en la sangre, y el tabaquismo son factores que contribuyen a la formación de placa. En la fase final de la aterosclerosis se producen fenómenos de fibrosis dando lugar a una placa fibrosa o fibroateroma, con abundante colágeno que se muestra como un relieve en la superficie intravascular, llegando a la obstrucción de la luz de la arteria (Ernst, 1993).

La gravedad de la isquemia está relacionada directamente con el lugar en el que se produzca y el tiempo que tarde en revertir. Cuando la obstrucción afecta a las arterias cerebrales puede aparecer desde ataques de isquemia cerebral transitoria, hasta accidentes cerebrovasculares agudos con secuelas más o menos permanentes. Si la obstrucción se produce en las arterias coronarias pueden aparecer angina de pecho o infarto de miocardio. Y cuando afecta a las arterias renales se facilita el desarrollo de insuficiencia renal o la aparición de un tipo especial de hipertensión denominada renovascular. La obstrucción de las arterias de las extremidades inferiores puede dar lugar a un cuadro de claudicación intermitente que se caracteriza por la presencia de dolores musculares. Por último, la presencia de lesiones ateroscleróticas complicadas en la aorta favorece el desarrollo de aneurismas aórticos (Figura 8).



**Figura 8.-** Evolución y formación de la placa de ateroma y consecuencias a nivel cerebral y cardiaco.

### 3.- ESTATINAS Y PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

Es un hecho conocido que la reducción en los niveles plasmáticos de colesterol, en particular el unido a LDL, disminuye la morbimortalidad por enfermedades cardiovasculares y la mortalidad total. La biosíntesis de colesterol tiene lugar en el retículo endoplásmico a partir de acetyl-CoA, siendo el paso limitante de la síntesis la formación de ácido mevalónico por acción de la hidroximetil-glutaril CoA (HMG-CoA) reductasa. Al principio de la década de los 70, el grupo del Dr. Kurota comenzó la búsqueda de inhibidores de esta enzima que dio como resultado la producción de un compuesto activo producido por *Penicillium citrinum* al que denominaron mevastatina (Endo, 1992). A partir de ese momento se han desarrollado diversos compuestos que reciben el nombre genérico de “estatinas”, cuya utilización en individuos con valores elevados de colesterol ha permitido importantes logros en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad coronaria.

En 1994 el Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) marcó un punto de inflexión en la historia del colesterol y las enfermedades cardiovasculares, este estudio demostró que el tratamiento con estatinas reduce la mortalidad total, aún en sujetos con niveles basales de LDL colesterol considerados como “normales”. El Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS) (Jukema et al., 1995), también demostró que el efecto de pravastatina sobre la lesión arterial y la incidencia de eventos clínicos no dependían de los niveles basales de colesterol unido a LDL. Otro estudio con la misma estatina publicado en 1998, el West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOP), puso de manifiesto una disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares cercana al 35% en pacientes con elevación del colesterol muy moderada. Posteriormente, en el estudio The Cholesterol And Recurrent Events (CARE) (Plehn et al., 1999) se demostró una reducción del riesgo relativo del 32% en todos los eventos cerebro-vasculares de cualquier causa, lo cual sugirió un efecto de la pravastatina mayor que el de disminuir la concentración lipídica. Datos similares se han reportado en el estudio Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID, 1998). Más adelante el estudio Heart Protection Study (HPS, 2002) comprobó la tesis preexistente de que la disminución de la concentración de lípidos, por sí sola, no explica la disminución total del riesgo

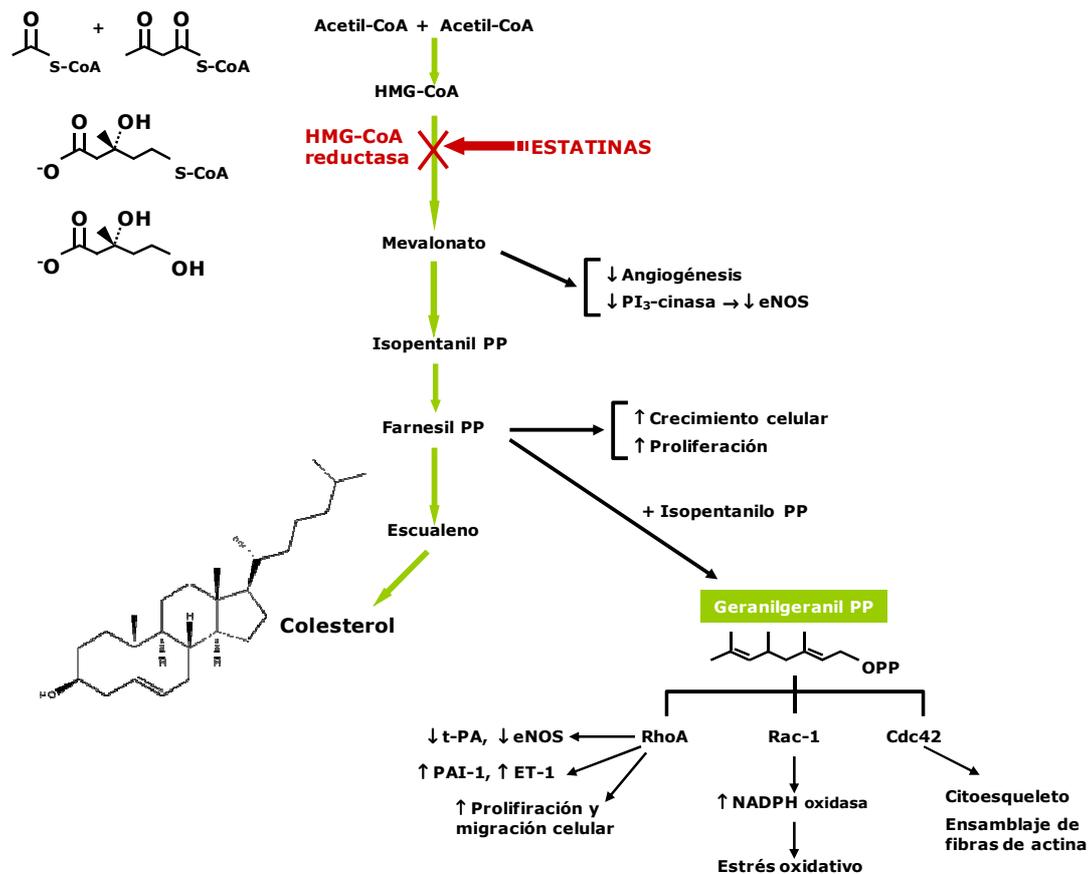
## 32 Introducción

cardiovascular en el grupo tratado con estatinas. Mas aún, datos del estudio Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) (Schwartz et al., 2001), demostraron que, en tan solo 16 semanas de tratamiento con atorvastatina, se produce una disminución de los episodios de isquemia miocárdica recurrente en aquellos pacientes con antecedentes de angina inestable o de infarto agudo de miocardio. Para que este efecto se logre en tan poco tiempo, se sugiere la existencia de otra acción, probablemente antiinflamatoria, que posibilite una estabilización de la placa aterosclerótica (Waters et al., 2002).

Todas estas investigaciones sugieren la hipótesis de la existencia de efectos independientes de la bajada de los niveles plasmáticos de colesterol para las estatinas y abren la posibilidad de extender el uso de estos fármacos a sujetos con valores de colesterol más bajos, con objeto de prevenir diversas enfermedades cardiovasculares, en particular la enfermedad coronaria.

Como indicamos anteriormente, la vía del mevalonato es la ruta metabólica a través de la cual se produce la biosíntesis del colesterol. Las estatinas, al inhibir la HMG-CoA reductasa, impiden no solo la síntesis de colesterol sino de otros productos intermedios de gran importancia fisiológica (Figura 9). El mevalonato es precursor de diversos isoprenoides, productos imprescindibles en el funcionamiento celular (Weisgraber et al., 1990). Uno de los primeros isoprenoides de la vía es el isopentanol-pirofosfato (IPP), que a su vez es precursor del farnesil-pirofosfato (FPP). La condensación de dos moléculas de FPP con IPP da lugar al colesterol. Por otro lado, la condensación del FPP con IPP da lugar al geranylgeranylpirofosfato trans (GGPPt) o geranylgeranylpirofosfato trans-cis (GGPPc). El GGPPc es el precursor del dolicol, un isoprenoide de cadena larga que participa en el proceso de la glicosilación de proteínas (Carroll et al., 1992). El GGPPt y el FPP están implicados en la modificación post-transcripcional de proteínas. Existen numerosas proteínas que han de someterse a este proceso para ser funcionales, entre ellas están proteínas G como las Rho GTPasas (Van Aelst y D'Souza, 1997). Las Rho GTPasas son proteínas monoméricas que se caracterizan porque pueden unir e hidrolizar GTP. Los diferentes miembros de la familia Rho (Rho, Rac, Cdc42, etc.) tienen funciones específicas relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina, la

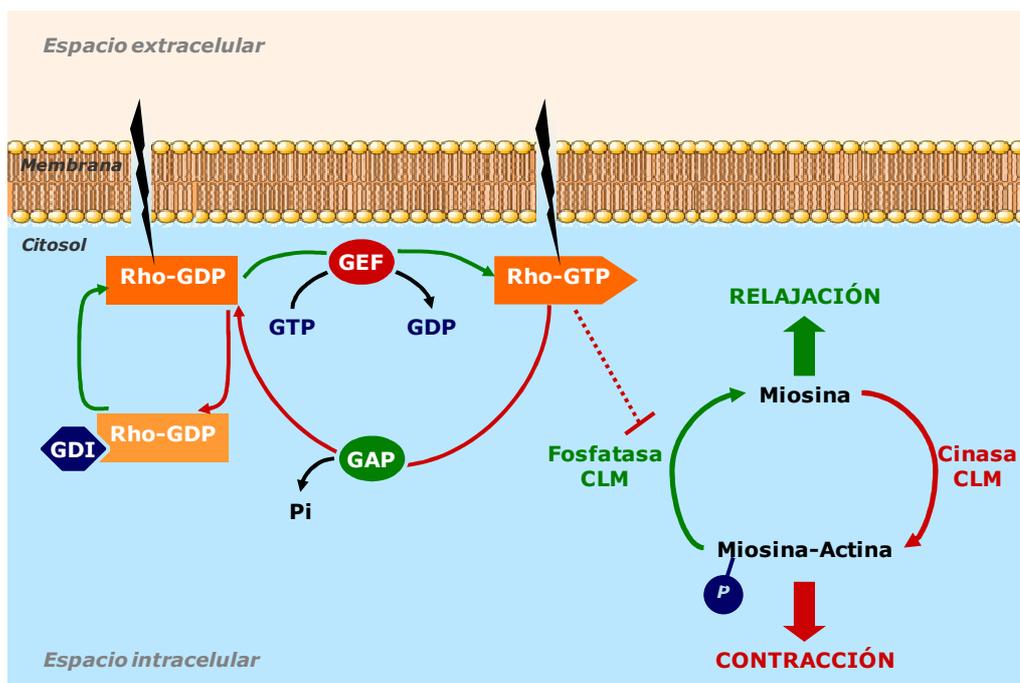
transcripción genética, transducción de la señal, conformación de la célula, motilidad, secreción, proliferación y estabilidad del ARN mensajero (Figura 9).



**Figura 9.-** Representación esquemática de la inhibición por estatinas de la biosíntesis del colesterol y de diferentes isoprenoides implicados en la señalización celular a través de proteínas de la familia Rho.

### Proteínas Rho

Las proteínas Rho están reguladas por 3 proteínas que se conocen por sus siglas en inglés: GEF (Guanine nucleotide exchange factor), GAP (GTPase activation protein) y GDI (Guanine nucleotide exchange inhibitor). En situación de reposo la mayoría de las proteínas Rho se encuentran distribuidas en el citoplasma unidas a GDI. Cuando se estimula la célula, Rho se separa de GDI, requisito indispensable para trasladarse a la membrana y activarse gracias a la acción de GEF, que favorece el intercambio de GDP por GTP. Unido a GTP, Rho es capaz de interactuar con sus efectores transmitiendo la señal. Cuando interviene GAP se pone en marcha la actividad hidrolasa intrínseca de Rho, GTP se transforma en GDP y se produce la inactivación. (Etiennes-Manneville y Hall, 2002) (Figura 10).



**Figura 10.-** Ciclo de activación e inactivación de las proteínas Rho y su acción sobre los procesos de contracción y relajación.

**RhoA** es el miembro prototipo de la subfamilia de proteínas que lleva su nombre. Esta subfamilia la integran tres isoformas: RhoA, RhoB y RhoC, que se encargan básicamente de la regulación del citoesqueleto y del ensamblaje de las fibras de estrés de actina (Wheeler y Ridley, 2004). La secuencia de aminoácidos es altamente homóloga y difieren principalmente en C terminal.

Un gran número de evidencias han demostrado la importancia de RhoA en la fisiología vascular. RhoA participa en la contracción, la diferenciación, la migración y la proliferación de las CMLV. En la contracción, hoy en día se reconoce RhoA como el principal regulador de la sensibilización al calcio de las proteínas contráctiles (Pfitzer, 2001), lo que permite regular la contracción a través de una de sus proteínas diana, la cinasa asociada a Rho (ROCK). ROCK es una proteína efectora de RhoA a la cual se une para realizar la mayoría de sus funciones biológicas. El principal sustrato de ROCK es la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (CLM), una enzima que en estado activo defosforila la CLM de forma que inhibe la contracción celular. Cuando RhoA activa ROCK se produce la fosforilación de la fosfatasa de la CLM, su inactivación y el mantenimiento de la contracción muscular.

A través de la inhibición de la isoprenilación de Rho, se inhibe la translocación de Rho a la membrana celular y la activación de ROCK se reduce (Liao et al., 2005), de hecho, los inhibidores de ROCK evitan el vasoespasma cerebral después de una hemorragia subaracnoidea (Shibuya et al., 1992). La vía de Rho/ROCK podría también regular funciones celulares independientemente del efecto sobre el citoesqueleto de la actina, por ejemplo, está implicada en la angiogénesis, hipertrofia cardíaca, fibrosis perivascular e hipertensión pulmonar (Higashi et al., 2003; Hyvelin et al., 2005; Rikitake, 2005).

La actividad de ROCK está a menudo elevada en el caso de trastornos del sistema cardiovascular. La inhibición de esta vía impide el desarrollo de la aterosclerosis (Mallat, 2003) y previene el remodelado arterial después de lesiones vasculares (Sawada et al., 2000). Fasudil, un inhibidor selectivo ROCK, mejora la función endotelial en pacientes con enfermedades coronaria (Nohria et al., 2006).

**Rac-1** es la isoforma más estudiada de las proteínas Rac y ha mostrado jugar un papel fundamental en una amplia variedad de procesos celulares. Los efectos de Rac-1 en las células cardiovasculares están mediados principalmente a través de la reorganización del citoesqueleto de actina y la actividad del complejo enzimático NADPH-oxidasa. Como hemos indicado anteriormente, la activación de Rac-1, al producirse el intercambio de GDP por GTP, determina la fosforilación de la subunidad p67<sup>phox</sup> de NADPH-oxidasa permitiendo la traslocación, y posterior unión, de las subunidades del citosol con las de la membrana, activando el sistema de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. El desarrollo de animales deficientes en Rac-1 y de inhibidores específicos ha permitido un mayor conocimiento del papel de estas GTP-asas en la fisiopatología cardiovascular. La activación de Rac1 se ha asociado con la aterosclerosis, proliferación de la neointima, hipertrofia cardíaca y disfunción endotelial (Sawada et al., 2000).

### **3.1.- Efectos pleiotrópicos de las estatinas**

#### **Estatinas y función endotelial**

La restauración de la función endotelial por estatinas deriva, por un lado, de su efecto hipolipemiante y, por otro, de su efecto directo sobre la célula endotelial (Wolfrum et al., 2003). En relación a éste último, las estatinas estimulan la expresión de eNOS y bloquean la síntesis de ERO, los dos defectos primarios implicados en la disfunción endotelial. Mecanismos adicionales relacionados o no con su efecto hipolipemiante contribuirían a restablecer la producción endotelial de NO (Mason et al., 2004). Numerosas evidencias experimentales indican que las estatinas producen una mejora significativa de la función endotelial que precede, incluso, a la reducción de los niveles séricos de colesterol (Omori et al., 2002).

La Tabla 2 resume los efectos de las estatinas sobre la célula endotelial, sus mediadores bioquímicos y los beneficios fisiológicos derivados de tales efectos. Como puede observarse, la totalidad de los efectos descritos implican la mediación de las proteínas de la familia Rho o de la proteína cinasa B (Akt).

Las estatinas, al reducir la prenilación de RhoA y Rac disminuirán su actividad alterando su anclaje a los compartimentos membranosos en los que desarrollan su actividad reguladora de múltiples vías. De esta manera interfieren en la biodisponibilidad de NO, la respuesta a mediadores como ET-1 o Ang II y los procesos inflamatorios.

<b>Efecto</b>	<b>Mediador</b>	<b>Beneficio</b>
↓ <b>Actividad de NADPH-oxidasa</b>	Rac-1	↓ Estrés oxidativo
↑ <b>Actividad de eNOS</b>	RhoA, Akt	↑ Función endotelial
↓ <b>Síntesis ET-1</b>	Rho	↑ Función endotelial
↓ <b>Expresión del receptor AT<sub>1</sub></b>	Rho	↑ Función endotelial
↑ <b>Expresión activador tisular del plasminógeno</b>	Rho	↓ Trombosis
↓ <b>Expresión de PAI-1</b>	Rho	↓ Trombosis
↓ <b>Expresión de moléculas de adhesión</b>	Rho	↓ Inflamación

**Tabla 2.-** Efectos pleiotrópicos de estatinas

Los niveles de NO se mejoran con estatinas debido a que se produce un incremento en la vida media del ARNm de la eNOS y un aumento de su síntesis (Wolfrum et al, 2003). Otro mecanismo por el que las estatinas pueden regular la actividad de la eNOS es a través de la caveolina (Figura 11). Como hemos mencionado antes, la eNOS unida a caveolina se encuentra en un estado inactivo y niveles altos de esta proteína se asocian con una reducción de la síntesis de NO.

## 38 Introducción

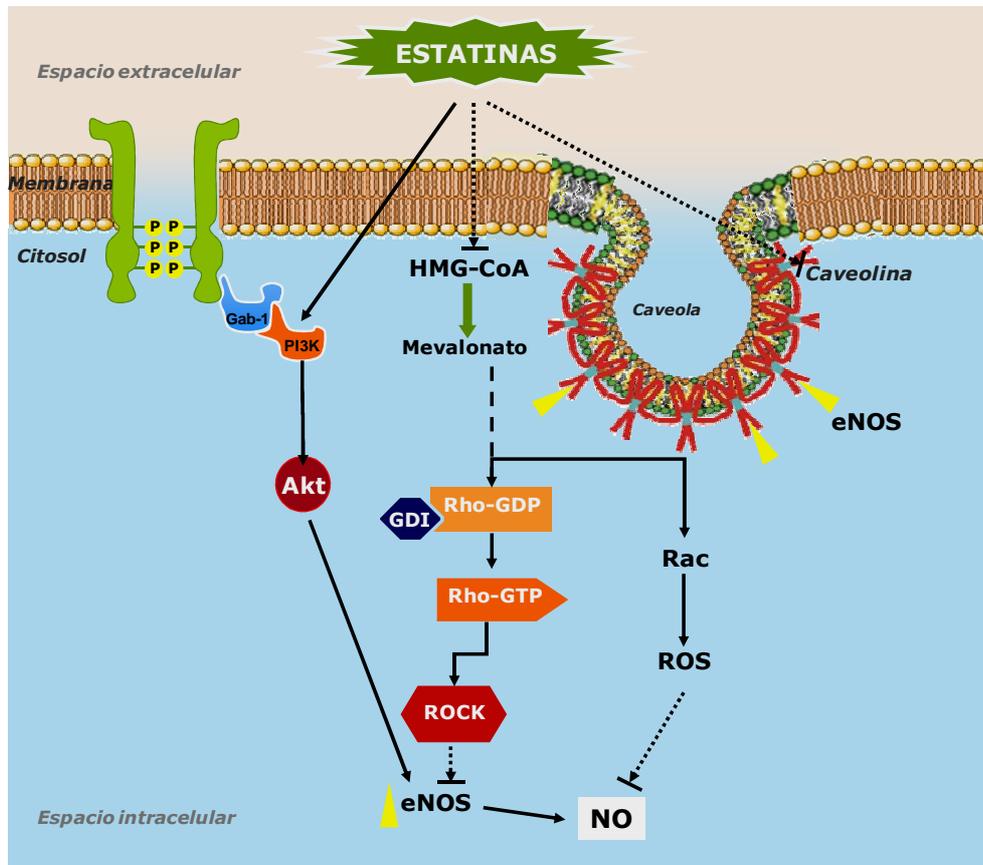
Atorvastatina ha demostrado mejorar la producción de NO mediante una reducción de los niveles de caveolina-1 (Feron et al., 2001).

Las estatinas también activan la Akt al promover su fosforilación por la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3). Akt es una proteína reguladora del metabolismo celular y de la apoptosis que afecta, entre otras dianas, a la eNOS. La fosforilación de eNOS por esta cinasa aumenta su actividad e incrementa la producción de NO en las células endoteliales (Kureishi et al., 2000; Wolfrum et al., 2003) (Figura 11).

La reactividad vascular es compleja e involucra gran variedad de mediadores. ET-1 es uno de estos mediadores que se sintetiza en las células endoteliales y contribuye a desórdenes vasculares, entre ellos la disfunción endotelial (Zeicher et al., 1995). Las estatinas podrían atenuar la síntesis de ET-1 de forma indirecta al incrementar la biodisponibilidad de NO. Además, se ha descrito que varias estatinas reducen la expresión de ARNm de la pre-pro-endotelina (Lerman et al., 1991; Lefer et al., 1999). Posteriormente, se demostró que la presencia de las proteínas Rho y su geranilgeranilación son esenciales para la expresión de este gen (Hernandez-Perera et al., 2000). Esta evidencia sugiere que un posible papel de las estatinas en la terapia de las enfermedades cardiovasculares está asociado con el control de los niveles elevados de ET-1.

Otro mecanismo por el cual las estatinas pueden mejorar la función endotelial es por su capacidad para disminuir los niveles de ERO por distintas vías. Por un lado inhiben la actividad de la NADPH-oxidasa mediada por Rac-1, por otra parte al reducir la expresión del receptor AT<sub>1</sub> reducen la síntesis de radicales libres mediada por Ang II (Wassmann et al., 2001). Parte del efecto antioxidante de las estatinas podría deberse a la restauración del acoplamiento de la eNOS, fuente importante de superóxido en las condiciones desacoplantes de la hipercolesterolemia, como hemos señalado previamente (Wolfrum et al., 2003) (Figura 11).

También se ha propuesto que ciertos metabolitos de algunas estatinas, como atorvastatina y fluvastatina, podrían contribuir a su poder antioxidante vía captación directa de radicales libres. Hay que resaltar que la mayoría de estudios que demuestran las propiedades antioxidantes directas de las estatinas, utilizan dosis suprafarmacológicas de las mismas.



**Figura 11.-** Vías de regulación de la biodisponibilidad de NO por estatinas.

### Estatinas e inflamación

Altas concentraciones circulantes de algunas moléculas marcadoras de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) o PCR se han asociado al desarrollo de HTA, alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa, así como a la disfunción endotelial y la inflamación vascular (Nawrocki y Scherer, 2004; Pi-Sunyer, 2006; Greenberg y Obin, 2006). La inflamación vascular podría desempeñar un papel relevante en el inicio y la progresión de la hipertensión.

## 40 Introducción

Aunque los mecanismos generales que explican el incremento de marcadores de la inflamación en la HTA son controvertidos, de manera más específica se ha observado que la Ang II puede inducir la liberación de citocinas, a través de la activación del factor de transcripción NFkB en las células vasculares (Li, 2006; Savoia y Schiffrin, 2007). Este factor está relacionado con la formación de la placa de ateroma y la aterosclerosis y ambos procesos son de origen inflamatorio (Ross R., 1999b). Los aspectos moleculares relacionados con el NFkB incluyen mecanismos de transcripción sensibles al estado oxidativo. Este factor activa la expresión de genes implicados en respuestas inmunes e inflamatorias, tales como moléculas de adhesión, moléculas quimiotácticas, como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la interleucina-8 (IL-8), enzimas proinflamatorias como la COX-2 y proteínas protrombóticas como el factor tisular y el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Barnes y Karin, 1997; Egido et al., 2000).

En los últimos años se han puesto de manifiesto diferentes efectos antiinflamatorios de las estatinas debidos tanto a su capacidad hipolipemiente como a sus efectos pleiotrópicos. Las estatinas interfieren con las moléculas proinflamatorias que participan en el desarrollo de la placa de ateroma de una manera independiente de su acción hipolipemiente. Diversos trabajos han estudiado la influencia de las estatinas sobre NFkB observando que producen una disminución de su actividad. Esto se ha relacionado por un lado con la vía de Rho, implicada en la activación NFkB, pero también con una acción directa de las estatinas sobre la expresión de factores como el Kruppel-like factor (KLF) y el inhibidor Kappa cinasa beta (IKKB) que controlan la actividad de NFkB (Parmar et al., 2005; Alvarez et al., 2006).

Las estatinas pueden disminuir los niveles de PCR, otro marcador importante de actividad inflamatoria, tanto en pacientes hipercolesterolémicos, como indican los resultados del estudio ATOMIX realizado con atorvastatina en pacientes con hiperlipidemia (Gómez-Gerique et al., 2002), como en normocolesterolémicos (Nawawi et al., 2003; Ridker, 2003; Sugiyama et al., 2005). Otras evidencias de las acciones antiinflamatorias de las estatinas apuntan a que estos fármacos atenúan la expresión de P-selectina y la adhesión de leucocitos en los animales normocolesterolémicos mediado por un incremento en la producción de NO

endotelial (Lefer et al., 1999; Scalia et al., 2001). Este efecto colesterol-independiente de las estatinas estuvo ausente en ratones con deficiencia de eNOS, lo que sugiere que los efectos protectores vasculares de las estatinas están mediados por esta enzima (Stalker et al., 2001). En conclusión, diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, han puesto de manifiesto la capacidad antiinflamatoria de las estatinas. Estos resultados nos indican que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa pueden contribuir, a través de diferentes acciones, a la estabilización de la placa de ateroma y, así, reducir el número de eventos cardiovasculares.

### **Estatinas e hipertrofia cardiaca**

La hipertrofia cardiaca es un fenómeno adaptativo que se observa tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Durante el crecimiento, las células del corazón sufren procesos hipertróficos hasta que éste alcanza su tamaño adulto. También en el caso de los atletas, el ejercicio continuado induce un crecimiento adaptativo en el miocardio, necesario para satisfacer la demanda de oxígeno del organismo. En ambas situaciones la hipertrofia cardiaca desarrollada se caracteriza por un crecimiento uniforme de las paredes ventriculares y del septo, unido a un incremento en el tamaño de las cámaras. En cambio, en la hipertrofia patológica predomina la hipertrofia concéntrica, en la que tanto las paredes del ventrículo izquierdo como del septo se engrosan y se reduce el tamaño de las cámaras. Los cambios observados se deben, en su mayoría, a un incremento en el tamaño de los cardiomiocitos, aunque no se pueden descartar otros factores como un incremento en el número de células cardiacas o en la matriz extracelular (Heineke y Molkentin, 2006).

La hipertrofia cardiaca es una respuesta adaptativa del corazón a la sobrecarga de presión, siendo una manifestación clínica bastante común en la hipertensión, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardiaca. Varios estudios han demostrado que la hipertrofia ventricular izquierda (HVI), incluso en ausencia de hipertensión arterial, es un factor de riesgo importante para predecir la posible presencia de enfermedades cardiacas más severas. La HVI se inicia normalmente como un proceso adaptativo beneficioso, sin embargo a medida que progresa la patología en

## 42 Introducción

respuesta a distintos estímulos, entre ellos la sobrecarga de presión, debemos tener en cuenta no solamente los cambios observados en el miocito, sino también los producidos en el espacio intersticial. La matriz extracelular está constituida principalmente por colágeno tipo I, principal determinante de la resistencia pasiva del tejido. Los mecanismos moleculares implicados en la respuesta hipertrófica del miocito determinan también un incremento en la deposición de colágeno con un aumento de la rigidez del tejido (Sadoshima et al., 1993; Pérez et al., 2002).

La respuesta a la sobrecarga de presión lleva a la liberación, secreción y producción de péptidos vasoactivos, como la Ang II y ET-1, que desempeñan un papel importante en la inducción de respuestas hipertróficas (Kobayashi et al., 1999; Kim e Iwao., 2000; Varagic y Frohlich, 2002) mediante la modulación de diversas vías de señalización intracelular, como la activación de proteína-quinasas (la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y la PI3) o las pequeñas proteínas de unión a GTP.

La Ang II juega un papel importante en la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno, lo que determina un incremento de la fibrosis cardiaca (Sadoshima et al., 1993). Este efecto profibrótico puede estar mediado por la estimulación de la expresión de PAI-1 y/o del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ). El primero promueve la fibrosis al inhibir las metaloproteinasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular (Brown et al., 2000) y el segundo, estimula la diferenciación y síntesis del colágeno y fibronectina así como la formación de miofibroblastos (Kawano et al., 2000).

La producción de radicales libres es otro factor importante en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca y sabemos que Ang II participa en la producción de dichos radicales en el miocardio a través de la activación de la NADPH-oxidasa (Bendall et al., 2002).

La ET-1 es un potente vasoconstrictor que también ejerce un efecto trófico y profibrótico sobre el corazón. Recientemente se ha observado que existe una implicación del sistema RhoA/ROCK en el desarrollo de hipertrofia mediada por ET-1 en cultivos de cardiomiocitos (Hunter, 2009). Los procesos fibróticos mediados, por este péptido, se han relacionado con un incremento de factores de crecimiento

como el factor de crecimiento de tejido conectivo, el factor de crecimiento de endotelio vascular o el factor de crecimiento derivado de plaquetas que regulan la acumulación de matriz extracelular (Kemp, 2004; Recchia et al., 2009). Además podemos establecer una relación entre ET-1 y Ang II pues se ha descrito que esta última incrementa la expresión del gen de pre-proendotelina en fibroblastos (Reddy et al., 2005).

Las estatinas pueden mejorar las alteraciones producidas en el corazón actuando a diferentes niveles. Como hemos comentado la Ang II juega un papel fundamental en los procesos de remodelado cardiaco, ejerciendo su acción mediante la estimulación del receptor AT<sub>1</sub>, y las estatinas disminuyen la expresión de dicho receptor. Por otra parte, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que las estatinas reducen los niveles de PAI-1 (Swiatkowska et al., 2002; Mukai et al., 2007) y modulan el efecto de ET-1 (Hernández-Perera et al., 2000). Además disminuyen la producción de ERO por su interferencia con la NADPH-oxidasa (Takemoto et al., 2001; Maack et al., 2003) y mejoran la biodisponibilidad de NO (Nakagami et al., 2003).

### **Estatinas y remodelado vascular**

La pared vascular es capaz de cambiar su estructura a través de un proceso denominado “remodelado”, es un proceso adaptativo que se produce como respuesta a los cambios, a largo plazo, en las condiciones hemodinámicas. Estos cambios se pueden producir durante el desarrollo o el envejecimiento y sobre todo pueden formar parte en la fisiopatología de determinadas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión y la diabetes.

El concepto de remodelado vascular se ha definido como un mecanismo complejo en el que se encuentran involucrados procesos de crecimiento y atrofia. En este sentido, el remodelado puede conllevar un incremento en la cantidad de material del vaso, o sea, la capa media crece invadiendo la luz y dando lugar a un incremento del área de la pared y de la proporción pared/luz (remodelado hipertrófico), o una reorganización de los distintos componentes de la pared vascular sin cambio en la

cantidad de material, los diámetros externo e interno están reducidos, el área de la capa media no está afectada y la relación pared/luz aumenta (remodelado eutrófico) (Mulvany et al., 1996; Mulvany, 2002a; Mulvany, 2002b).

Los procesos involucrados en el remodelado vascular son el crecimiento alterado de las CMLV, el incremento de la matriz extracelular y de moléculas de adhesión local, la apoptosis, la fibrosis, la inflamación con el aumento de genes proinflamatorios sensible al estado redox (Gibbons y Dzau, 1994).

La Ang II contribuye al remodelado vascular mediante la activación de las cascadas de transducción que promueven la vasoconstricción, el crecimiento celular y la inflamación. El citoesqueleto participa en las respuestas adaptativas estructurales de los vasos, los filamentos del citoesqueleto median las respuestas vasoactivas y transducen tanto estímulos mecánicos como señales farmacológicas. Algunos de los cambios que ocurren en el remodelado vascular, específicamente en las CMLV, son inducidos por la Ang II que activa la vía transduccional Rho/Rhocinasa y regula el citoesqueleto (Wesselmam y De Mey, 2002). De hecho, Rho se ha asociado directamente con el remodelado vascular patológico.

El NO también desempeña un papel importante en el remodelado vascular. Además de regular el tono vascular e inhibir la agregación plaquetaria, se ha demostrado que participa en la degradación de la matriz extracelular y en la migración de células endoteliales, procesos cruciales durante el remodelado vascular (Wiest y Crossman, 2002). Por otra parte, el  $O_2^{\cdot-}$ , liberado por el NADPH-oxidasa, participa en el remodelado estimulando el crecimiento de las CMLV y provocando la hipertrofia de la capa media (Zafari et al., 1998).

Durante los procesos de remodelado se produce un desequilibrio entre el crecimiento y la apoptosis de las CMLV y las estatinas, mediante la inhibición de la síntesis de moléculas de naturaleza isoprenoide, reducen la migración y proliferación de estas células e inducen su apoptosis, restableciendo así el equilibrio (Veillard y March, 2002). Por otro lado, las estatinas pueden mejorar la función endotelial al recuperar el balance entre NO y  $O_2^{\cdot-}$  y disminuir los efectos de Ang II, por último podrían mantener la capacidad de respuesta normal de las CMLV mediante la



## 46 Introducción

Entre las estatinas, la pravastatina ha demostrado repetidamente producir beneficios clínicos y mejorar la supervivencia en prevención primaria (WOSCOPS) y secundaria (CARE), pero con el descubrimiento de nuevas estatinas y la necesidad de investigarlas, disminuyó el interés de pravastatina en la investigación. En la última década, pravastatina ha vuelto a protagonizar las páginas de las revistas médicas, por sus supuestas nuevas propiedades. Una de las más impactantes sería su capacidad para prevenir las enfermedades cardiovasculares por su efecto antiinflamatorio. Un estudio de la Universidad de Boston, dirigido por Dr. Cannon concluyó, después de analizar los casos de más de 4000 pacientes con síndrome coronario agudo, que el tratamiento con pravastatina se asocia con reducción de la PCR a corto plazo y con efectos beneficiosos a nivel clínico independientemente de su efecto hipolipemiante (Ray y Cannon, 2005).

No menos sorprendente son los resultados obtenidos en otras investigaciones que tienen que ver con la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Un estudio realizado por Karatzis et cols. ha relacionado el consumo de este fármaco con una disminución del estrés oxidativo independientemente de la bajada del nivel plasmático del colesterol (Karatzis et al., 2010). Otro trabajo, publicado recientemente, sostiene que pravastatina inhibe también la NADPH-oxidasa (Álvarez et al., 2010).

En las páginas de las revistas científicas, se han descrito otras singulares aplicaciones: una de ellas le hizo ocupar lugar privilegiado en la revista *American Journal of Physiology-Heart and Circulation Physiology* tiene que ver con su efecto beneficioso sobre el óxido nítrico (Harris et al., 2004).

En base a estos antecedentes y por ser una de las más extensamente estudiadas por la medicina clínica (Shepherd et al., 1995), elegimos la pravastatina para este trabajo. Además al ser soluble en agua permite la administración en el agua de bebida de los animales durante el tratamiento crónico y facilita la realización de estudios *in vitro*. Con este estudio pretendemos contribuir a un mayor conocimiento de la pravastatina en el campo de la hipertensión y sus complicaciones.

*METODOLOGÍA Y RESULTADOS*



## **TRATAMIENTO CRÓNICO CON PRAVASTATINA**

### **1.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los experimentos se han realizado teniendo en cuenta las disposiciones legales existentes referidas a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

- a) Directiva 2003/65/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se modifica la directiva 86/609/CEE (Diario oficial de la Unión Europea).
- b) Real decreto 1201/2005. BOE 21 de octubre de 2005.

La justificación por la cual se han utilizado ratas para llevar a cabo esta investigación es por su gran similitud con la especie humana en la patología que se estudia en este trabajo, por su uso estandarizado en las investigaciones y en la bibliografía internacional, así como por el hecho de que en nuestro laboratorio exista una gran experiencia en su manejo, su coste económico y su fácil manipulación. En concreto, se han utilizado machos pertenecientes a dos cepas diferentes:

a) Ratas SHR, éste es un modelo de hipertensión desarrollado en 1963, a partir de ratas Wistar Kyoto, por medio de la selección y cruce de machos de hipertensión moderada y hembras con hipertensión establecida, se considera un modelo de hipertensión donde se ha seleccionado el fenotipo. Los animales tienen la presión arterial elevada y presentan el fenotipo de daño en órganos similar al observado en la hipertensión esencial en humanos, incluyendo hipertrofia del ventrículo izquierdo, ataque al corazón y fallo renal (McBride et al., 2004).

b) Ratas WKY, es la cepa utilizada como control normotenso de las ratas SHR. A las diez semanas de edad presentan unos valores de presión arterial sistólica (PAS) que oscilan entre 120-140 mmHg, que se mantiene prácticamente toda su vida, por lo que son útiles para establecer y evaluar las diferencias que puedan producirse como consecuencia del estado hipertensivo y del tratamiento en ratas SHR.

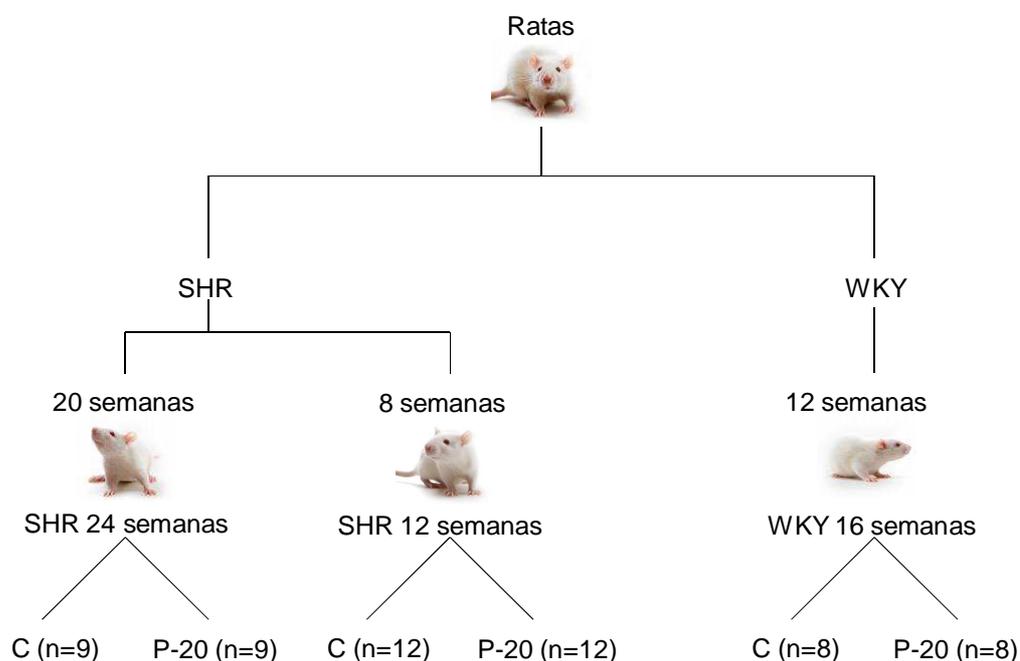
Ambas especies se suministraron por el laboratorio Janvier (Francia) a través del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (Registro N-SA001 P.A.E.). Los animales se comenzaron a controlar dos semanas antes de

## 50 Metodología y resultados

empezar el estudio, cuando las ratas SHR tenían 8 y 20 semanas de edad y las ratas WKY 12 semanas se inició el tratamiento que se prolongó durante 4 semanas. Los animales de cada lote se distribuyeron en distintos grupos en función de su peso corporal (PC) y sus valores de PAS, de tal forma que en todo momento hubiera el mismo número de animales de cada grupo y así evitar las posibles variaciones estacionales o de otro origen que pudieran influir en los resultados.

Los animales se mantuvieron en el estabulario del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, alojados en jaulas a una temperatura de  $22\pm 1$  °C, con una humedad ambiental del 60% y con un tiempo de luz regulado con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se distribuyeron en un máximo de tres animales por jaula con acceso libre a comida (Global Diet, 2014, Harlan, Francia) y bebida.

Como hemos mencionado anteriormente, utilizamos ratas SHR de diferentes edades (8 y 20 semanas) y ratas WKY (12 semanas). Tras un periodo de monitorización sin tratamiento, cada uno de los grupos se divide a su vez en grupo control (C) que recibe agua y grupo tratado con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20). El esquema siguiente muestra la distribución de los grupos:



El fármaco, suministrado por los laboratorios A. Menarini Industrie Farmaceutiche Riunite Srl (Florencia, Italia), se administró disuelto en el agua de bebida, ajustando la concentración semanalmente en función del peso corporal y el consumo diario de agua. Durante el periodo de tratamiento se realizaron medidas periódicas de la PAS. Al final del estudio se recogen muestras de orina y sangre. A continuación se sacrifican los animales y se extraen diversos tejidos para la realización de estudios de reactividad vascular, histológicos, western blotting, etc.

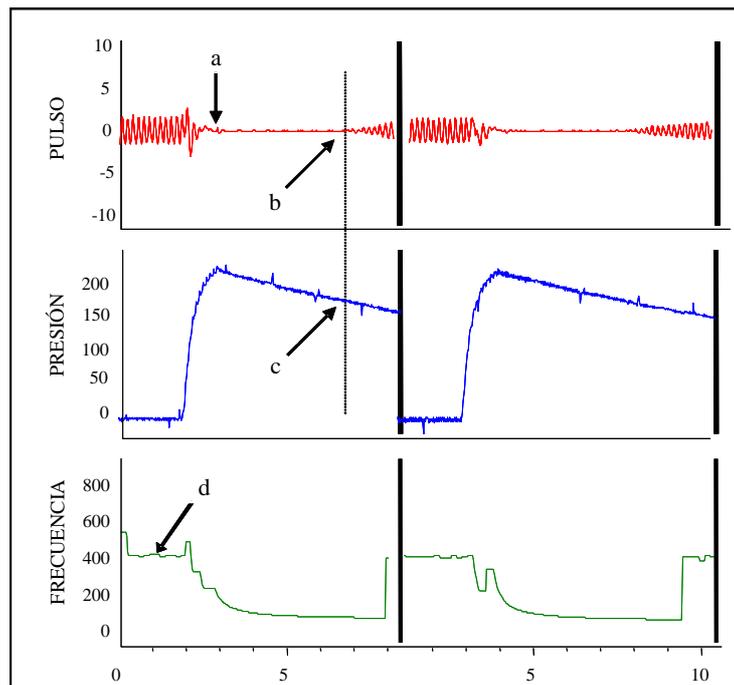
## **2.- ESTUDIOS *in vivo***

### **Control de la presión arterial sistólica**

La PAS se determina mediante el método incruento de medida en la cola. Este método tiene la ventaja de ser simple, reproducible, no traumático y además permite trabajar con el animal despierto. Para obtener buenos resultados es conveniente habituar el animal a este tipo de manipulación antes de realizar las medidas definitivas, para lo cual a los animales se les mide la PAS al menos una semana antes del inicio de los tratamientos con el fin de que se familiaricen con el proceso y el manejo al que se someten. Las medidas se realizan a la misma hora y siempre en lugar con temperatura, ruido y limpieza adecuados para el bienestar de los animales.

Las ratas se sitúan en un cepo, de manera que la cola quede libre para poder colocar el manguito y el transductor. Para captar mejor la señal, se procede a la dilatación de la arteria caudal mediante la aplicación de calor durante un periodo de unos cinco minutos. Se utiliza un equipo NIPREM 546 (Cibertec S.A, España) que mediante un software y un equipo informático adecuado (Sistema Computerizado PowerLab/800 para Windows, AD Instruments, Reino Unido) permite la monitorización y obtención de los valores de PAS (Figura 13). El fundamento de la medida consiste en comprimir el tejido alrededor de la arteria caudal, mediante un manguito neumático, hasta la oclusión completa de la arteria, un detector de infrarrojos colocado en la cola transforma la señal térmica en eléctrica que se monitoriza por medio de un ordenador. Según se observa en la figura 13, la desaparición de la señal (a) permite afirmar que se ha producido la oclusión de la arteria. La disminución controlada de la presión en el manguito neumático, se acompaña de la aparición de la onda de pulso (b). La presión neumática medida en ese punto es igual a la PAS en la arteria (c), el registro de la onda pulsátil permite medir simultáneamente la frecuencia cardiaca, en pulsaciones por minuto (ppm) a partir de este registro (d).

El criterio de validez de las medidas se basa en la obtención de seis valores consecutivos que no difieran en más de 10 mmHg entre sí, estableciendo el valor de la PAS como la media de esos seis valores. Se determina el valor de la PAS antes de comenzar el tratamiento y a las 1, 2, 3 y 4 semanas después del comienzo del mismo.



**Figura 13.-** Sistema de medida de la presión arterial y frecuencia cardiaca y detalle de un registro original en la arteria caudal de rata.

### **Expresión y análisis de los resultados**

Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de un mínimo de ocho animales. Para comparar los valores obtenidos entre los grupos tratados con pravastatina y sus correspondientes controles se realiza el análisis ANOVA de dos vías y el ANOVA de una vía para evaluar la progresión de los valores de presión a lo largo del tiempo en un mismo grupo. En ambos casos Bonferroni se utiliza como prueba post-test, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

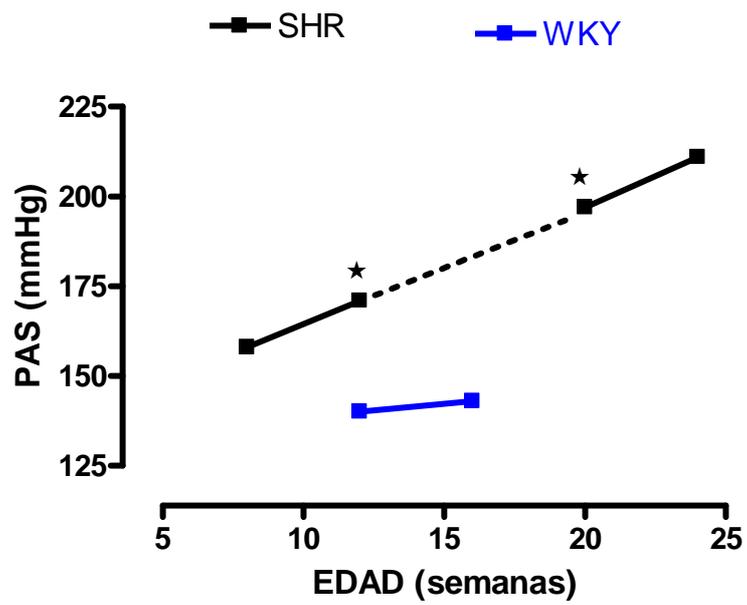
### **Resultados**

En la figura 14 podemos observar la evolución de la PAS durante el estudio en ratas SHR y WKY. En los animales hipertensos los valores de presión se incrementan de manera muy importante, pasando de  $158 \pm 1$  mmHg a las 8 semanas a  $211 \pm 2$  mmHg a las 24 semanas. La PAS de las ratas WKY se mantuvo constante en el periodo estudiado (en torno a 140 mmHg).

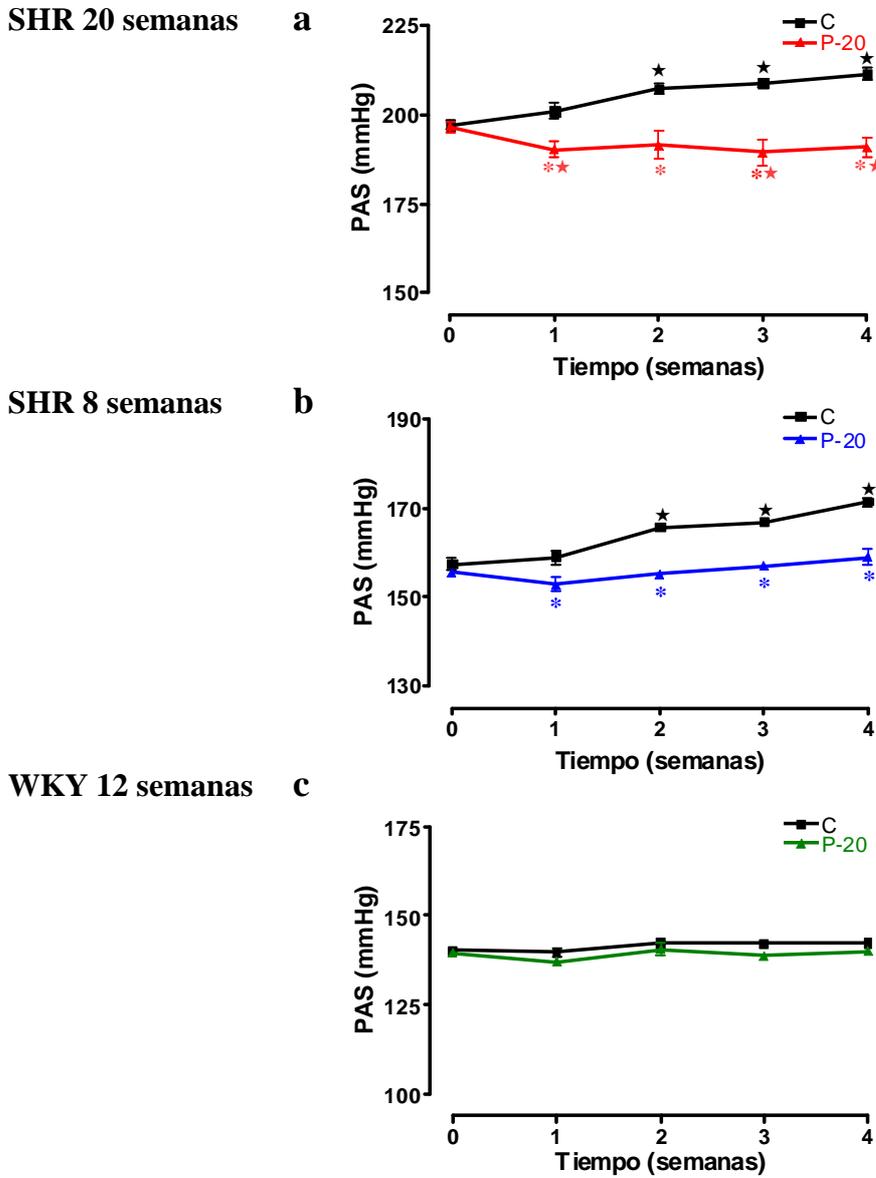
El tratamiento de las ratas SHR con pravastatina produjo diferencias estadísticamente significativas entre animales control y tratados, tanto si este tratamiento se iniciaba a las 20 semanas (Figura 15a) como si lo hacía a las 8 semanas (Figura 15b). En este primer caso, además, observamos un ligero efecto hipotensor, con valores significativamente más pequeños en el grupo tratado al final del estudio si se comparan con los valores iniciales.

La pravastatina no modificó en ningún momento la PAS de las ratas WKY (Figura 15c).

Estas diferencias entre SHR y WKY no se observaron en el caso de la frecuencia cardíaca ni se modificaron con el tratamiento.



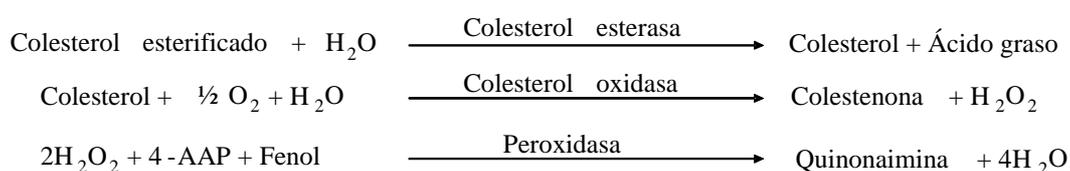
**Figura 14.-** Evolución de la presión arterial sistólica (PAS, mmHg) a lo largo del estudio en ratas genéticamente hipertensas (SHR) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY). \* $p < 0,05$  frente a los valores iniciales.



**Figura 15.-** Evolución de la presión arterial sistólica (PAS, mmHg) a lo largo del estudio en ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 20 semanas (a), 8 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 12 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*p<0,05 frente al grupo control, \*p<0,05 frente a los valores iniciales.

### 3.- NIVELES DE COLESTEROL

Para determinar los valores plasmáticos del colesterol se utiliza un kit comercial (Colesterol, BioSystem, España). Como se muestra en el esquema, el colesterol esterificado se transforma en colesterol libre por la acción de la colesterol esterasa. A continuación, el colesterol se oxida por la colesterol oxidasa formando colesteno y peróxido de hidrógeno, el cual, con fenol y 4-aminoantipirina (4-AAP) en presencia de peroxidasa, forma un compuesto coloreado (quinonaimina) que se cuantifica por espectrofotometría.



Una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de plasma se mezcla, en la cubeta del espectrofotómetro, con 1 mL del reactivo del kit que contiene la mezcla de enzimas y tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 500 nm. El mismo procedimiento se realiza con un patrón de colesterol (200 mg/dL). La concentración de colesterol en la muestra se expresa en mg/dL y se calcula a partir de la siguiente fórmula:

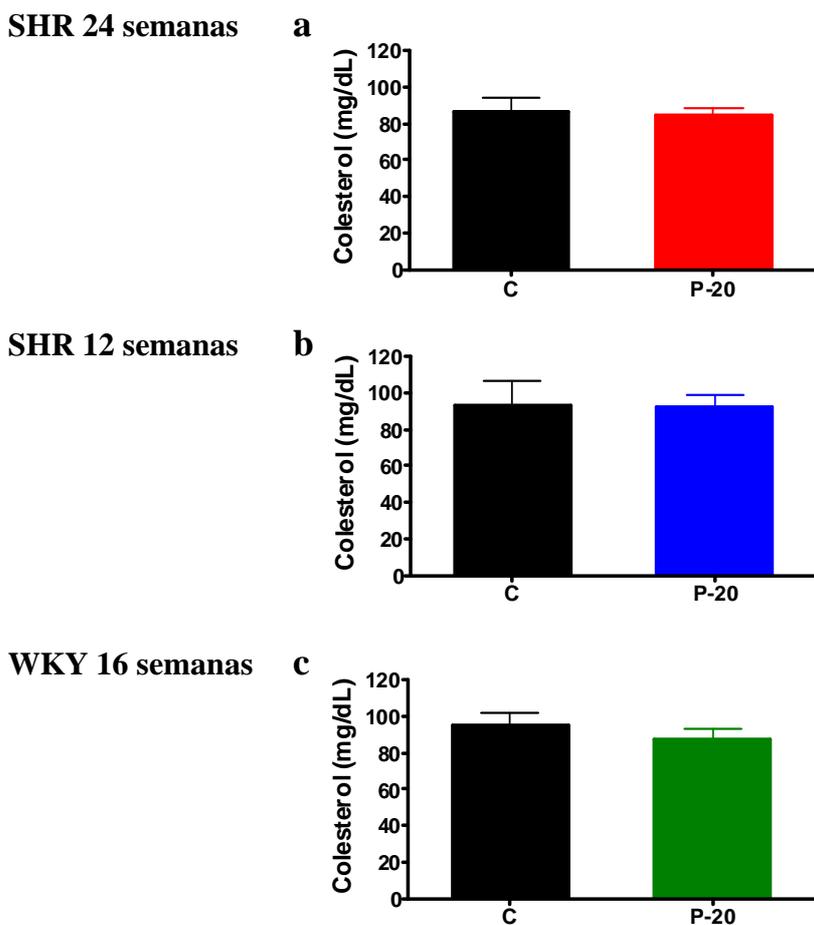
$$\text{Colesterol}_{\text{muestra}} = \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{patrón}}} \times \text{Colesterol}_{\text{patrón}}$$

#### Expresión y análisis de los resultados

Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 animales. Para comparar las diferencias entre grupos control y tratados se utiliza la prueba “t” de Student para datos no pareados, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Los niveles de colesterol plasmático determinados al final del periodo de estudio fueron similares en ratas WKY y SHR. La edad de éstas últimas tampoco afectó a este parámetro. En la figura 16 podemos observar que el tratamiento con pravastatina no modificó los niveles de colesterol en ninguno de los tres grupos de ratas.



**Figura 16.-** Niveles de colesterol total en plasma de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.

#### **4.- ESTUDIOS *in vitro***

Finalizados los tratamientos, las ratas se anestesian con pentobarbital sódico a la dosis de 60 mg/Kg por vía intraperitoneal. A continuación se canula la arteria carótida, con un catéter (PE-50, Intramedic®, Becton Dickinson, EE.UU.) para recoger muestras de sangre, seguidamente se procede a la extracción de la arteria aorta, del árbol vascular mesentérico, y a la canulación del riñón izquierdo, para la realización de estudios de funcionalidad. También se extraen el corazón y el riñón derecho, que se pesan y se congelan a -80 °C para determinaciones posteriores o se procesan para estudios histológicos.

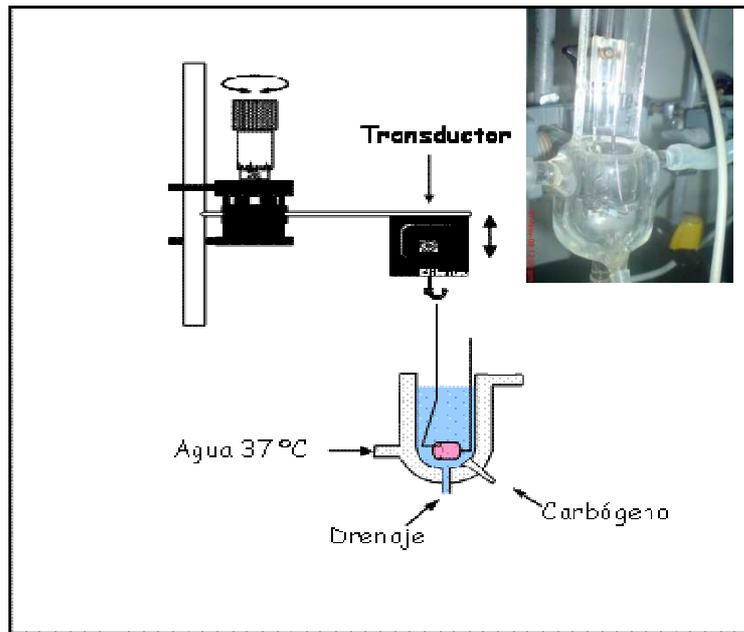
##### **4.1.- Estudios de funcionalidad: arteria aorta**

Se utiliza un sistema de baños de órgano aislado, como el que se presenta en la figura 17, que poseen una doble pared de vidrio delimitando una cámara, que a su vez se encuentra conectada a un circuito cerrado por cuyo interior circula agua mantenida a una temperatura constante de 37 °C, mediante una bomba termostática (TECTRON 4373200 Selecta, España), que actúa al mismo tiempo como bomba, elemento calefactor y termostato. La parte inferior del baño tiene un orificio a través del cual se hace llegar de manera controlada la cantidad deseada de carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, Air Liquide, España). El interior del baño contiene una cantidad conocida de líquido nutricio que asegura la inmersión completa del tejido. Este líquido se elimina por una salida situada en la parte inferior de la copa e inmediatamente se rellena con solución nutritiva nueva a 37°C, de forma que los cambios de temperatura sean mínimos.

Una vez extraída la arteria aorta se procede a la eliminación del tejido conectivo y graso que la rodea, cortándola en segmentos de 3 mm mediante un sistema de cuchillas ideado en nuestro laboratorio. A través de la luz de los anillos se introducen dos alambres finos de acero inoxidable y se colocan en los baños que contienen 5 mL de solución Krebs a 37 °C gaseada con carbógeno (NaCl 118,7 mM; KCl 4,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; glucosa 11,1 mM). Uno de los alambres se fija al baño de órganos y el otro se

## 60 Metodología y resultados

conecta al transductor isométrico (UF-1, Harvard Apparatus Inc., EE.UU.). Los cambios de tensión se registran mediante un sistema de adquisición de datos PowerLab/800 (AD Instruments, Reino Unido).

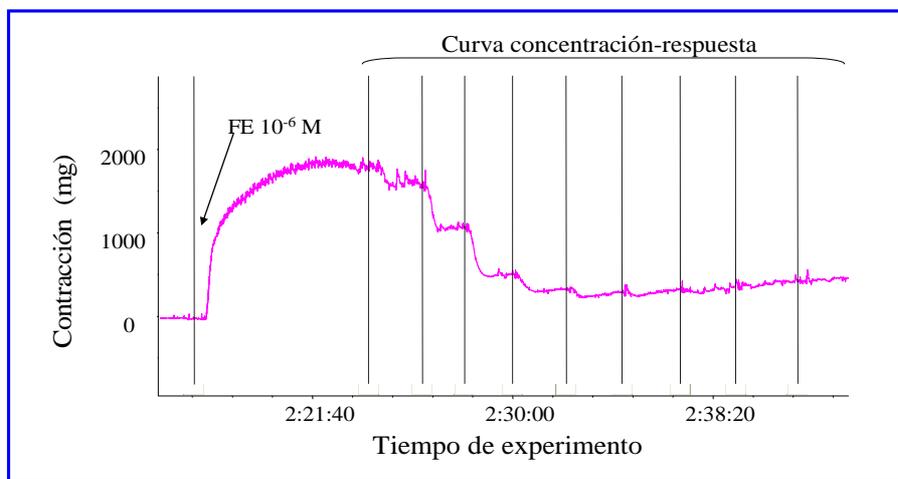


**Figura 17.-** Baño de órganos y transductor isométrico.

Todos los anillos se someten a una tensión de 2 g y se dejan estabilizar 60 minutos renovando la solución nutritiva cada 30 minutos. Si es necesario, la tensión se reajusta a 2 g. La funcionalidad del tejido se comprueba añadiendo al baño fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M), una vez alcanzada una meseta de contracción se añade ACh ( $10^{-6}$  M), cuya respuesta relajante nos indica el estado funcional del endotelio. A continuación se lavan repetidamente los anillos, tras 30 minutos (tiempo aproximado que tarda el anillo en recuperar la tensión basal) se renueva la solución, se reajusta la tensión si es necesario y se deja estabilizar la preparación durante 30 minutos más. En este momento se procede a la realización de los siguientes experimentos:

### Curvas concentración-respuesta a agentes relajantes

Previa contracción de los anillos con FE ( $10^{-6}$  M) y una vez alcanzada una meseta de contracción estable, como se ha mencionado previamente, se realizan curvas acumulativas concentración-respuesta de los siguientes agentes relajantes: ACh ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M), cuya acción relajante es endotelio dependiente (Figura 18) y nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M), cuya acción relajante es independiente de la presencia del endotelio.

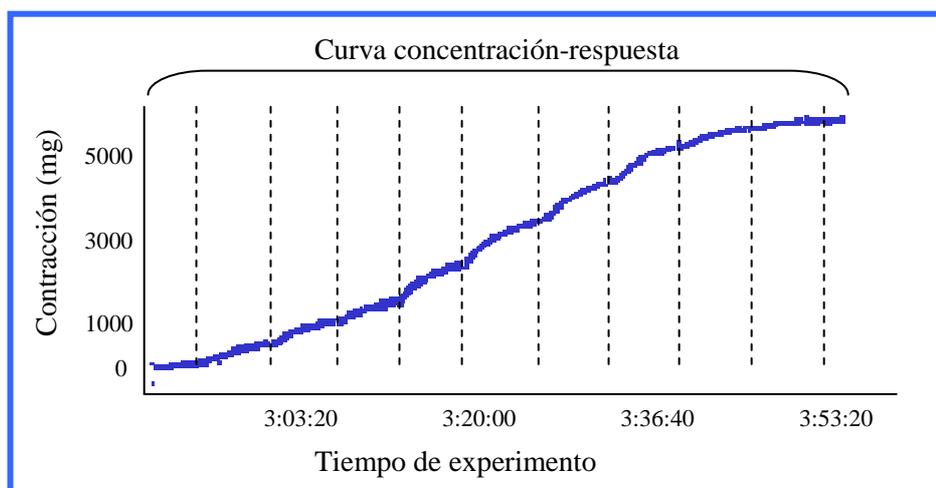


**Figura 18.-** Registro original de una curva de relajación a ACh en arteria aorta de rata.

Las curvas a ACh se repiten tras la incubación, durante 30 minutos, con indometacina ( $5 \times 10^{-6}$  M), con el fin de estudiar la participación de mediadores producidos por la COX en la respuesta relajante, con apocinina ( $10^{-3}$  M), para evaluar el efecto de la inhibición de la NADPH-oxidasa en la respuesta relajante y con N(G)monometil-L-arginina (L-NAME) ( $10^{-4}$  M) para evaluar el efecto de la inhibición de la eNOS.

### Curvas concentración-respuesta a agentes contracturantes

Se añaden al baño, de forma acumulativa, concentraciones crecientes de FE ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) o de un análogo de TXA<sub>2</sub> (U46619,  $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) esperando, antes de añadir la siguiente concentración, el tiempo suficiente para obtener una meseta estable de contracción, como se muestra en la figura 19.



**Figura 19.-** Registro original de una curva de contracción a FE en arteria aorta de rata.

### Expresión y análisis de los resultados

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. La respuesta a FE y U46619 se expresa en mg de contracción.

En todas las curvas concentración-respuesta se obtiene el valor de efecto máximo ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  (logaritmo cambiado de signo de la concentración del agonista que produce el 50% del efecto máximo). Este último parámetro se obtiene mediante el ajuste de las curvas a un modelo logístico no lineal utilizando el programa Graph Pad Prism version 4.0 (GraphPad software Inc., EE.UU.).

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 experimentos. Para comparar los valores obtenidos entre los grupos tratados y sus correspondientes controles se utiliza la prueba “*t*” de student para datos no pareados. Para comparar las curvas dosis respuesta en los diferentes grupos, se utiliza la prueba *F* de Snedecor. Los diferentes grupos control se comparan utilizando el analisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguida de Bonferroni. En todos los casos, se consideran diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Estudios de funcionalidad: arteria aorta**

#### **Curvas concentración-respuesta a acetilcolina**

Como podemos observar en la figura 20 y en los valores de  $E_{max}$  recogidos en la tabla 3A, la relajación producida por ACh en ratas WKY fue significativamente superior a la observada en las ratas SHR. Del mismo modo comprobamos que la pérdida de la función endotelial era mayor cuanto mayor era la edad de las ratas SHR, lo que corresponde con valores más elevados de PA.

El tratamiento durante 4 semanas con pravastatina afectó a la respuesta de ACh en ratas de 12 semanas produciendo una mejoría significativa de la relajación (Figura 20b). Cuando el mismo tratamiento se aplicó a animales entre las 20 y las 24 semanas de edad no se modificó la respuesta respecto a los animales control (Figura 20a). Tampoco observamos cambios en la respuesta a ACh por efecto de la pravastatina en ratas WKY, con función endotelial normal (Figura 20c). Los valores de  $pD_2$  fueron semejantes en animales normotensos e hipertensos y no se modificaron ni con la edad, ni con el tratamiento (Tabla 3A)

#### **Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico**

Los tres grupos controles mostraron diferencias significativas en la respuesta máxima obtenida con NTP. La relajación alcanzó valores cercanos al 100% en las ratas WKY y fue mayor en las ratas SHR de 12 semanas que en las de 24 semanas. En el grupo de las ratas SHR de 24 semanas, 12 semanas y las ratas WKY de 16 semanas no se observaron diferencias en las curvas de relajación obtenidas con NTP entre los grupos controles y tratados ni en la respuesta máxima ni en el  $pD_2$  (Figura 21, Tabla 3B).

#### **Curvas concentración-respuesta a fenilefrina**

La figura 22a muestra las curvas concentración respuesta de FE en el grupo de ratas SHR de 24 semanas, podemos observar que 20 mg/Kg/día de pravastatina no

modificó la respuesta contracturante. Al analizar los parámetros obtenidos mediante un ajuste no lineal de los datos experimentales, los valores de  $E_{max}$  y  $pD_2$  para ambos grupos fueron similares (Tabla 3C). Tampoco se obtuvieron diferencias en ratas SHR de 12 semanas (Figura 22b, Tabla 3C).

El tratamiento de las ratas WKY durante 4 semanas con pravastatina modificó los valores de  $E_{max}$  (Tabla 3C). En la figura 22c se ve que los anillos de aorta del grupo tratado respondieron menos a FE que los del grupo control.

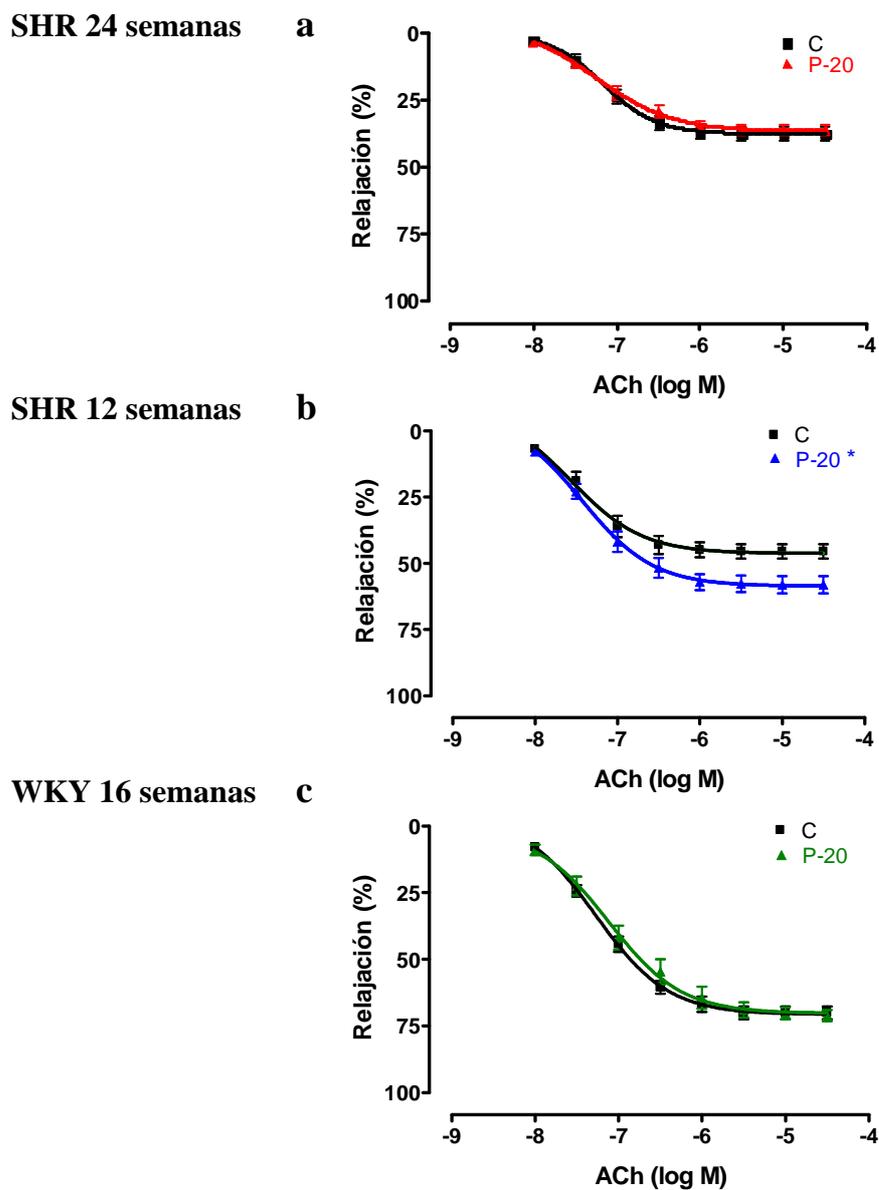
### **Curvas complementarias concentración-respuesta**

Como solamente se modificaba la respuesta relajante dependiente del endotelio en las ratas SHR de 12 semanas, planteamos unos ensayos complementarios con estas arterias. En algunos anillos las curvas de ACh se repitieron después de un periodo de incubación con apocinina, indometacina o L-NAME. Después de la incubación con apocinina se mejoró la relajación tanto en el grupo control como en el grupo tratado. La relajación máxima en los anillos del grupo control incubados con apocinina alcanzaron los valores del grupo tratado con pravastatina (Figura 23a, Tabla 4).

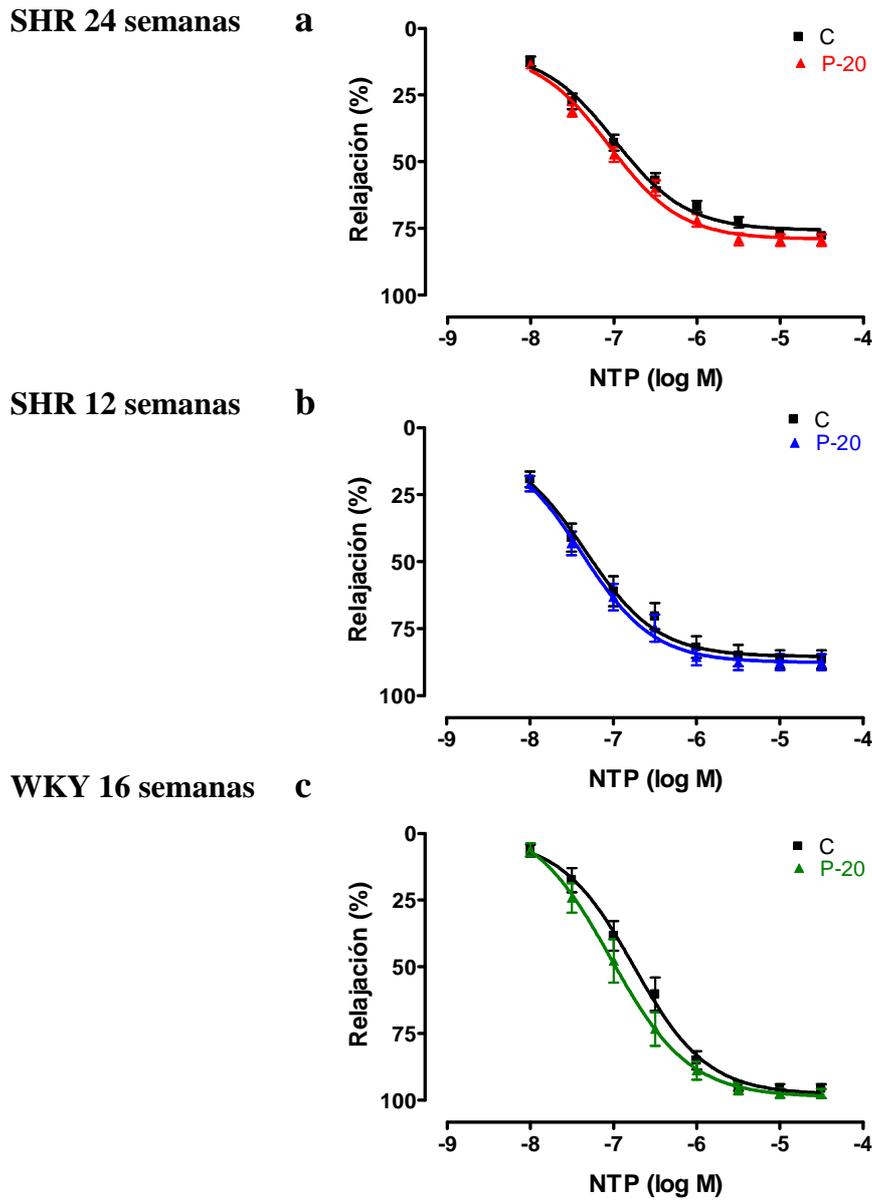
La incubación con indometacina mejoró la relajación en los grupos control y tratado, el incremento de la relajación fue mayor en el grupo tratado (40%) que en el control (23%) (Figura 23b, Tabla 4).

Después de la incubación con L-NAME la respuesta observada con ACh fue una respuesta contracturante significativamente mayor en los animales control (Figura 24), la respuesta máxima fue de  $1727 \pm 220$  mg en el grupo control frente a  $1058 \pm 181$  mg en el grupo tratado ( $p < 0,05$ ).

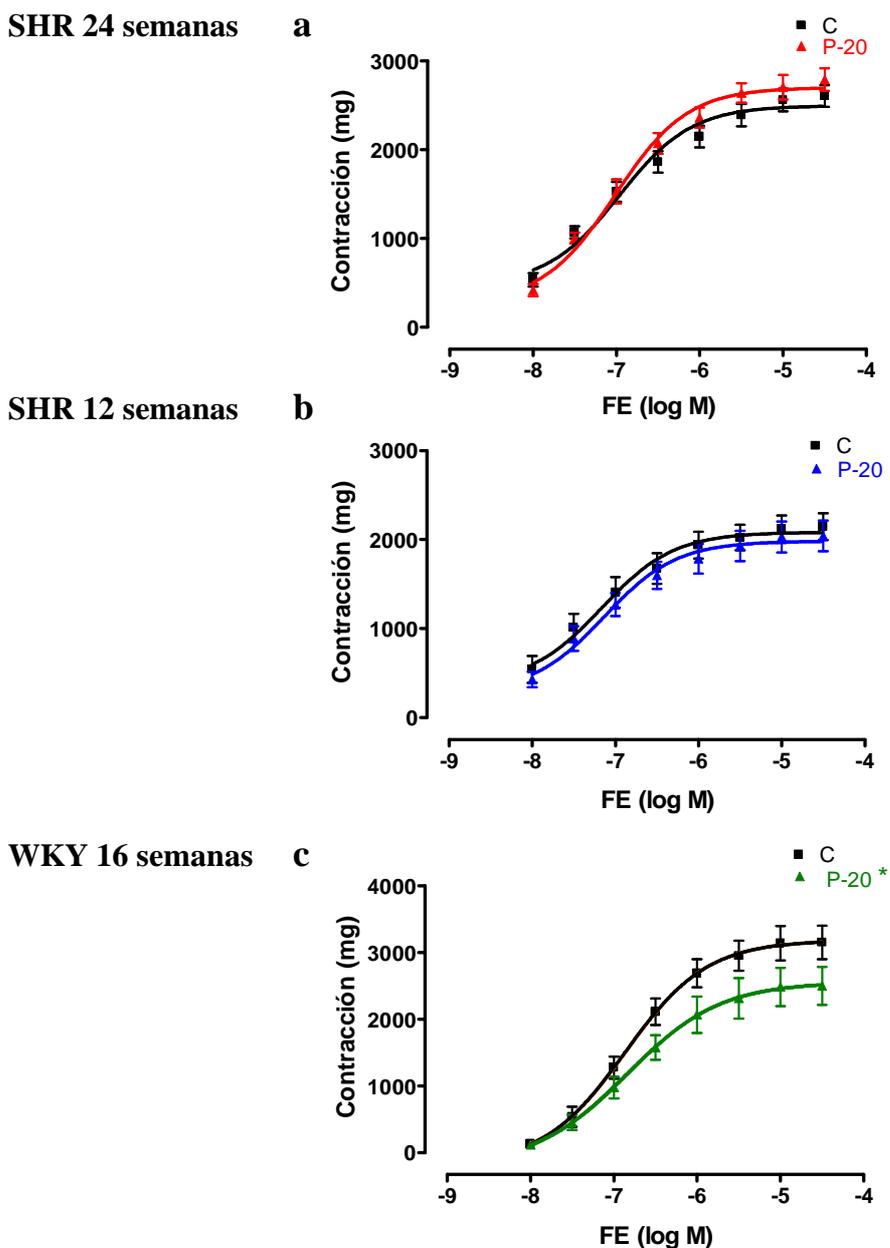
También hemos realizado curvas concentración respuesta al análogo del  $TXA_2$  (U46619). Como se puede observar en la figura 25 la contracción producida por este agente fue significativamente superior en los anillos control que en los anillos tratados.



**Figura 20.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en arteria aorta precontraída con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.



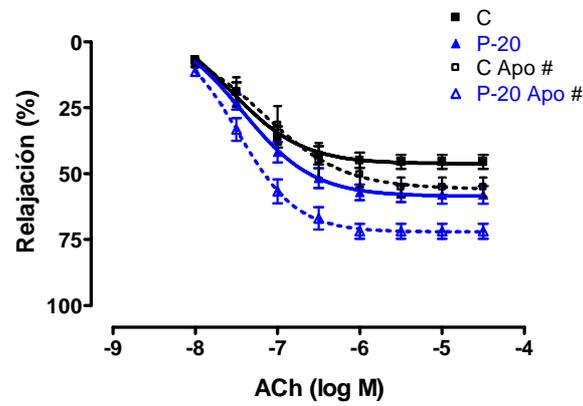
**Figura 21.-** Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en arteria aorta precontraída con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.



**Figura 22.-** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas **(a)**, 12 semanas **(b)** y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas **(c)** control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control.

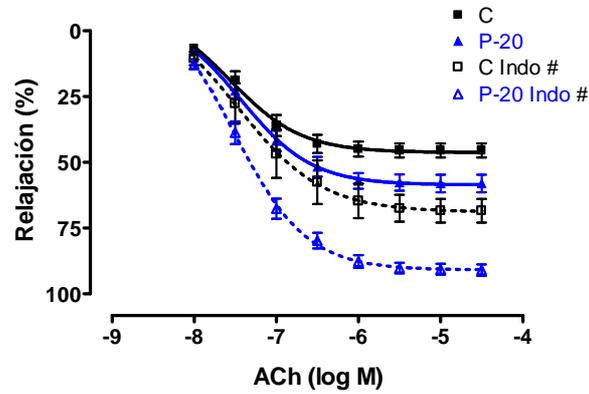
SHR 12 semanas

**a**



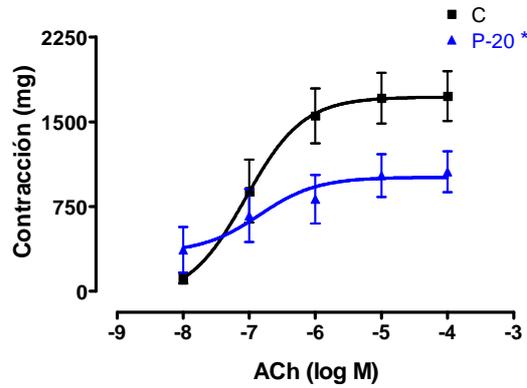
SHR 12 semanas

**b**



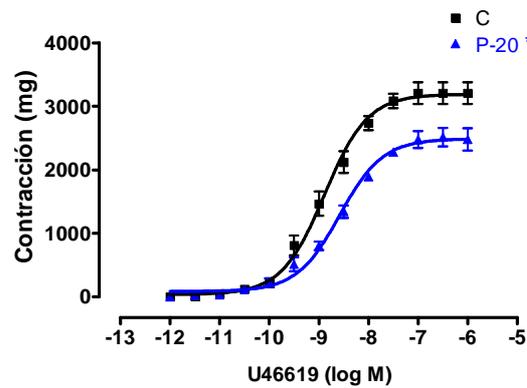
**Figura 23.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en arteria aorta precontraída con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 12 semanas, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. Respuesta relajante a ACh en ausencia y en presencia de apocinina (Apo,  $10^{-3}$  M) (**a**) o indometacina (Indo,  $5 \times 10^{-6}$  M) (**b**).  
# $p < 0,05$  comparando curvas en ausencia y en presencia de apocinina o indometacina.

**SHR 12 semanas**



**Figura 24.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 12 semanas e incubada durante 30 minutos con L-NAME ( $10^{-4}$  M), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

**SHR 12 semanas**



**Figura 25.-** Curvas concentración-respuesta a U46619, ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  M) en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 12 semanas, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

Acetilcolina A	C		P-20	
	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
SHR 24 semanas (n=5)	37,4±2,6 <sup>♦^</sup>	7,2±0,1	36,0±2,1	7,2±0,2
SHR 12 semanas (n=5-6)	45,5±2,6 <sup>♦</sup>	7,6±0,2	58,1±3,2 <sup>*</sup>	7,4±0,1
WKY 16 semanas (n=4)	70,7±1,2	7,3±0,1	70,3±1,8	7,1±0,1

Nitroprusiato sódico B	C		P-20	
	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
SHR 24 semanas (n=5)	76,0±1,7 <sup>♦^</sup>	6,9±0,1	79,3±2,1	7,1±0,1
SHR 12 semanas (n=5-6)	86,4±3,4 <sup>♦</sup>	7,3±0,1	87,5±3,0	7,4±0,1
WKY 16 semanas (n=4)	95,6±1,6	6,7±0,1	97,5±1,7	7,0±0,1

Fenilefrina C	C		P-20	
	E <sub>max</sub> (mg)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (mg)	pD <sub>2</sub>
SHR 24 semanas (n=7)	2605±120 <sup>♦^</sup>	6,7±0,1	2791±126	7,0±0,1
SHR 12 semanas (n=5-6)	2147±151 <sup>♦</sup>	7,2±0,2	2041±171	7,1±0,2
WKY 16 semanas (n=4)	3184±163	6,9±0,2	2555±219 <sup>*</sup>	6,8±0,3

**Tabla 3.-** Valores de respuesta máxima (E<sub>max</sub>) y pD<sub>2</sub> de las curvas concentración respuesta a acetilcolina (A), nitroprusiato sódico (B) y fenilefrina (C) en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24, 12 semanas y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. <sup>\*</sup>p<0,05 frente al grupo control, <sup>♦</sup>p<0,05 frente al grupo control WKY, <sup>^</sup>p<0,05 frente al grupo control SHR de 12 semanas.

<b>SHR 12 semanas (n=6)</b>			
<b>Acetilcolina</b>			
<b>E<sub>max</sub> (%)</b>			
<b>C</b>	42,5±2,6	<b>P-20</b>	58,1±3,2
<b>C Apo</b>	55,1±3,7 <sup>#</sup>	<b>P-20 Apo</b>	71.8±2,8 <sup>#</sup>
<b>C Indo</b>	68,4±4,4 <sup>#</sup>	<b>P-20 Indo</b>	90,9±2,1 <sup>#</sup>

**Tabla 4.-** Valores de respuesta máxima (E<sub>max</sub>), de las curvas concentración respuesta a acetilcolina en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 12 semanas antes y después de incubar durante 30 minutos con apocinina (Apo) y con indometacina (Indo), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. <sup>#</sup>p<0,05 comparando curvas en ausencia y en presencia de apocinina o indometacina.

#### 4.2.- Western blotting

El método del western blotting se basa en la separación de proteínas de una muestra por electroforesis, su transferencia a una membrana y la utilización de un anticuerpo específico frente a la proteína que se desea identificar, denominado anticuerpo primario. Posteriormente se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) que reacciona con el primario. La HRP del complejo, al reaccionar con un determinado sustrato, produce una reacción fácilmente detectable y proporcional a la cantidad de proteína estudiada. Hemos utilizado esta técnica para analizar si el tratamiento con pravastatina modifica la expresión de las proteínas COX-2 y eNOS en aorta.

Para la extracción y la cuantificación de proteínas, las aortas se homogenizan en tubos (Gente Macs, Alemania) durante 30 segundos a 2000 r.p.m en buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tris-HCl 10 mM, pH 8; NaCl 150 mM; EDTA 50 mM; aprotinina 1  $\mu$ g/mL; PMSF 1 mM; ortovanadato sódico 0,2 mM; NaF 1 mM y  $\beta$ -glicerolfosfato 1 mM) utilizando el sistema Dispomix System (Medic Tools, Suiza). Los desechos celulares se eliminan mediante centrifugación a 18.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se recupera el sobrenadante. En una alícuota de éste, se determina la concentración de proteínas por espectrofotometría usando el método de Bradford. En función de la cantidad de proteínas se añade la cantidad necesaria de tampón de carga (Tris 500 mM; 40% glicerol; 8% SDS; 4%  $\beta$ -mercaptoetanol; 0,5% azul de bromofenol) y se hierven durante 5 minutos. Las proteínas se separan en un gel de poliacrilamida (10%) con condiciones desnaturalizantes reductoras usando el método de Laemmli a un voltaje constante de 130 V (Laemmli, 1970).

A continuación, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Protran, Millipore, Alemania) con un sistema de transferencia húmedo. La cubeta se rellena con tampón de transferencia frío (Tris 20 mM; glicina 190 mM y 20% metanol) y se aplica una corriente eléctrica constante de 220 mA durante 90 minutos.

Las membranas se bloquean con de leche en polvo desnatada al 5% en tampón de lavado (TBS-T: Tris-HCl 20 mM; NaCl 137 mM; Tween-20 0,1%; pH 7,5) y se

incubaban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después del bloqueo se procede a la incubación con anticuerpo primario durante 90 minutos a temperatura ambiente en el caso de COX-2 o a 4 °C durante toda la noche en el caso de eNOS y de la tubulina (que se utiliza como control de carga de las muestras). A continuación, la membrana se lava tres veces durante 7 minutos con TBS-T y se incuba durante 30 minutos con anticuerpo secundario. Al terminar la incubación se lava 3 veces con TBS-T.

Las bandas se identifican con un sistema de detección basado en el luminol y potenciado con p-iodofenol (Ausubel et al., 1987). La emisión de luz debida a la reacción con la HRP conjugada con el anticuerpo secundario se detecta mediante la exposición de una película de autorradiografía sensible a la luz (super RX X-Ray Film, Fujifilm, India). La cuantificación de las bandas se hizo por densitometría usando el programa (Scion Image) y se expresaron en unidades arbitrarias respecto al control.

### **Expresión y análisis de los resultados**

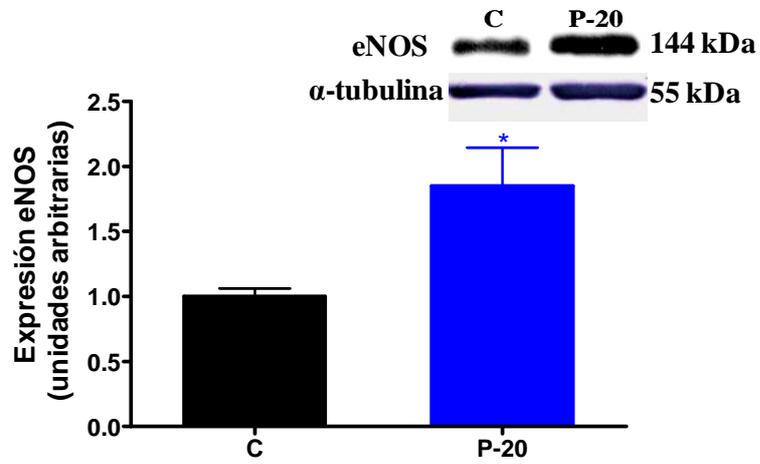
Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 muestras. Para comparar las diferencias entre grupos se utiliza la prueba “*t*” de Student para datos no pareados, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Como se puede observar en la figura 26 las aortas procedentes de animales de 12 semanas tratados con pravastatina presentaron un incremento en la expresión de la proteína eNOS respecto a sus controles (Figura 26a). En este mismo tejido la expresión de COX-2 fue significativamente menor en animales tratados que en animales control (Figura 26b). En ambos casos la expresión de  $\alpha$ -tubulina no mostró diferencias.

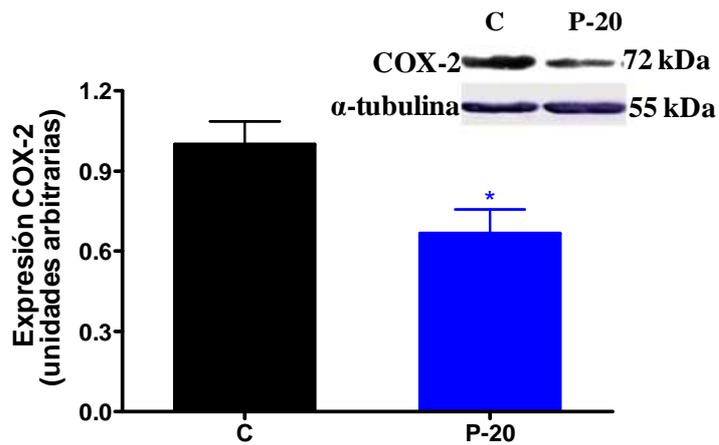
SHR 12 semanas

**a**



SHR 12 semanas

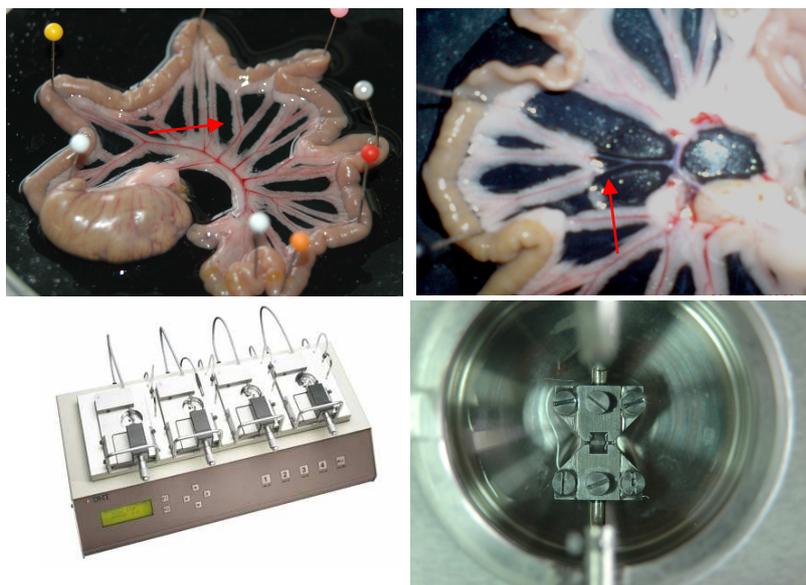
**b**



**Figura 26.-** Blots representativos y cuantificación densitométrica de la expresión de eNOS (**a**) y COX-2 (**b**) en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 12 semanas control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

### 4.3.- Estudios de funcionalidad: arterias mesentéricas

Para los estudios de funcionalidad en arterias mesentéricas se utilizó un miógrafo de alambre (Multiwire Myograph System, DMT Modelo 610M, Dinamarca) (Figura 27). Después de extraer el mesenterio se localiza la tercera rama del árbol vascular mesentérico y se procede a la eliminación del tejido conectivo y graso que rodea esta arteria y, a continuación se corta en anillos de aproximadamente 2 mm de longitud. A través de la luz de cada segmento se introducen dos alambres de acero inoxidable de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, uno se coloca en la parte fija o correspondiente al transductor, mientras que el otro se une a la parte móvil, que a su vez está unida a un tornillo micrométrico. Una vez que los anillos están montados en los baños, con solución Krebs a 37 °C y aireados con carbógeno, se deja un periodo de estabilización y posteriormente, se normalizan los anillos a una tensión equivalente a 90 mmHg según la técnica descrita por Mulvany (Mulvany y Halpern, 1977).



**Figura 27.-** Aislamiento y montaje de anillos de la tercera rama de las arterias mesentéricas.

Después de 30 minutos de estabilización se inicia el protocolo del ensayo. La funcionalidad del tejido se comprueba añadiendo al baño FE ( $10^{-5}$  M) y una vez alcanzada una meseta de contracción estable se añade ACh ( $10^{-6}$  M) cuya respuesta relajante nos indica el estado funcional del endotelio. Posteriormente se lavan repetidamente los anillos, se dejan estabilizar durante 30 minutos para que el anillo recupere la tensión basal, se renueva la solución Krebs y se dejan estabilizar 15 minutos más. Pasado este periodo se analizan respuestas relajantes a ACh ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) y NTP ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M).

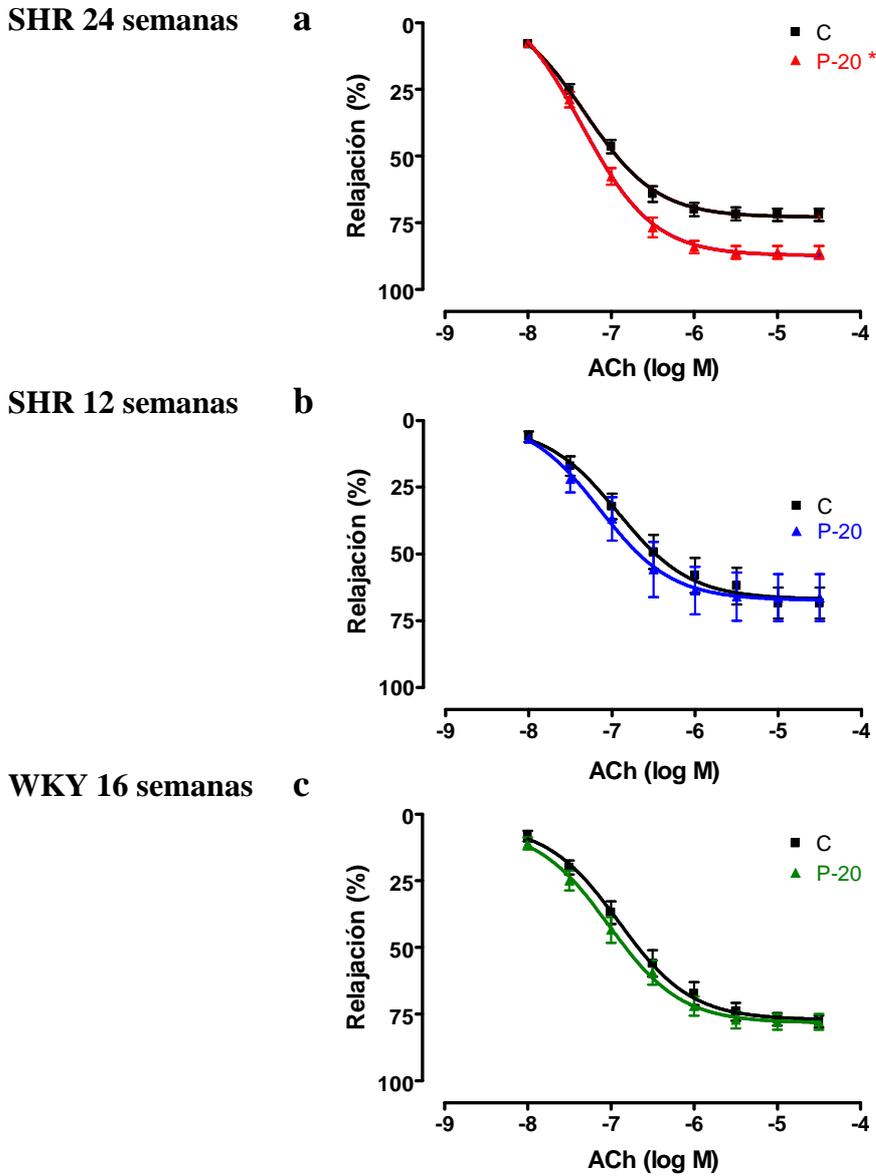
### **Expresión y análisis de los resultados**

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. En cada serie de experimentos, los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 experimentos. El análisis estadístico se realiza como se indicó en el apartado 4.1.

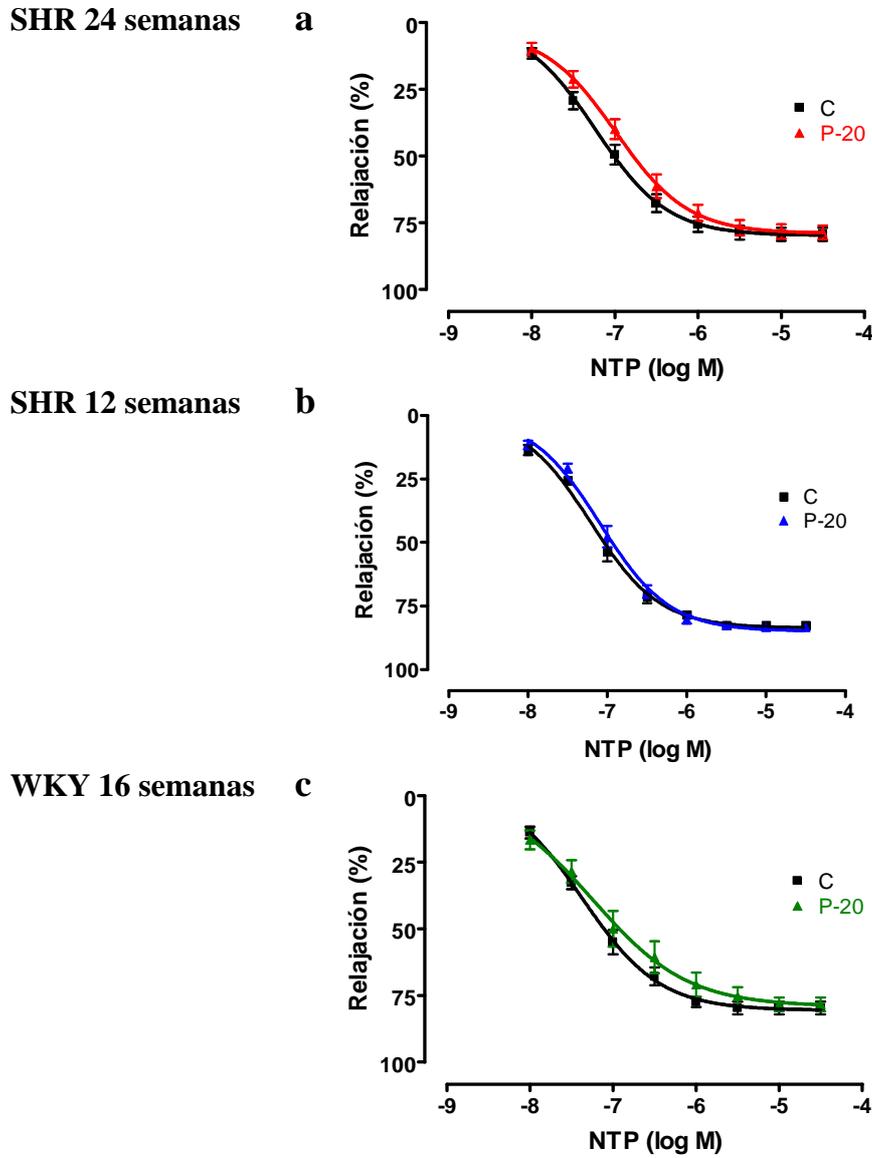
### **Resultados**

La relajación máxima a ACh fue ligeramente menor en las ratas SHR control de 24 y 12 semanas comparando con las ratas WKY aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística (Tabla 5A). El tratamiento con pravastatina produjo una significativa mejoría en la capacidad relajante dependiente del endotelio solo en el grupo de ratas de 24 semanas (Figura 28).

Todos los grupos control respondieron de manera similar a NTP, como puede observarse en las curvas dosis respuesta (Figura 29) y en los parámetros obtenidos del análisis de esas curvas (Tabla 5B). El tratamiento con pravastatina no modificó ninguno de estos parámetros.



**Figura 28.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en arterias mesentéricas precontraídas con fenilefrina (FE,  $10^{-5}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.



**Figura 29.-** Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en arterias mesentéricas precontraídas con fenilefrina (FE,  $10^{-5}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**) 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.

<b>Acetilcolina</b> <b>A</b>	<b>C</b>		<b>P-20</b>	
	<b>E<sub>max</sub> (%)</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>E<sub>max</sub> (%)</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>
<b>SHR 24 semanas (n=9-6)</b>	71,9±2,3	7,3±0,1	86,1±2,4*	7,4±0,1
<b>SHR 12 semanas (n=6-8)</b>	68,4±5,8	7,3±0,1	66,4±8,8	7,7±0,3
<b>WKY 16 semanas (n=4)</b>	77,7±2,2	6,9±0,1	77,8±2,9	7,1±0,1

<b>Nitroprusiato sódico</b> <b>B</b>	<b>C</b>		<b>P-20</b>	
	<b>E<sub>max</sub> (%)</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>	<b>E<sub>max</sub> (%)</b>	<b>pD<sub>2</sub></b>
<b>SHR 24 semanas (n=6)</b>	79,3±2,4	7,2±0,0	78,6±3,4	6,9±0,1
<b>SHR 12 semanas (n=6-8)</b>	82,5±1,3	7,2±0,0	83,3±1,3	7,1±0,1
<b>WKY 16 semanas (n=4)</b>	79,7±2,3	7,4±0,2	78,3±2,6	7,2±0,2

**Tabla 5.-** Valores de relajación máxima ( $E_{max}$ ) y  $pD_2$  de las curvas concentración-respuesta a acetilcolina (**A**) y nitroprusiato sódico (**B**) en arterias mesentéricas de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24, 12 semanas y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

#### 4.4.- Estudios de funcionalidad: riñón perfundido

Como indicamos anteriormente, una vez sacrificado el animal, el riñón izquierdo se canula cuidadosamente por la unión entre la arteria renal y la aorta abdominal. El catéter (PE-50, Intramedic® Becton Dickinson, EE.UU.) introducido en la arteria renal se conecta simultáneamente, mediante una llave de tres vías, con el transductor de presión (Transpac® IV, modelo L969, Abbot Critical Care Systems, Irlanda), que permite registrar los cambios en la presión basal de perfusión, y una bomba de perfusión (Masterflex L/S, Cole-Palmer, EE.UU.) que asegura un flujo constante (Figura 30).

La perfusión se realiza con solución Krebs gaseada con carbógeno a una temperatura de 37 °C y a un flujo constante de 3 mL/min. Los cambios de presión detectados por el transductor se registran mediante el sistema informático PowerLab/800 para Windows.

Después de 15 minutos de estabilización, se comprueba la funcionalidad del tejido con KCl (80 mM) en el líquido de perfusión hasta alcanzar una meseta de contracción estable. A continuación se cambia la perfusión de KCl por solución Krebs para recuperar la presión basal.

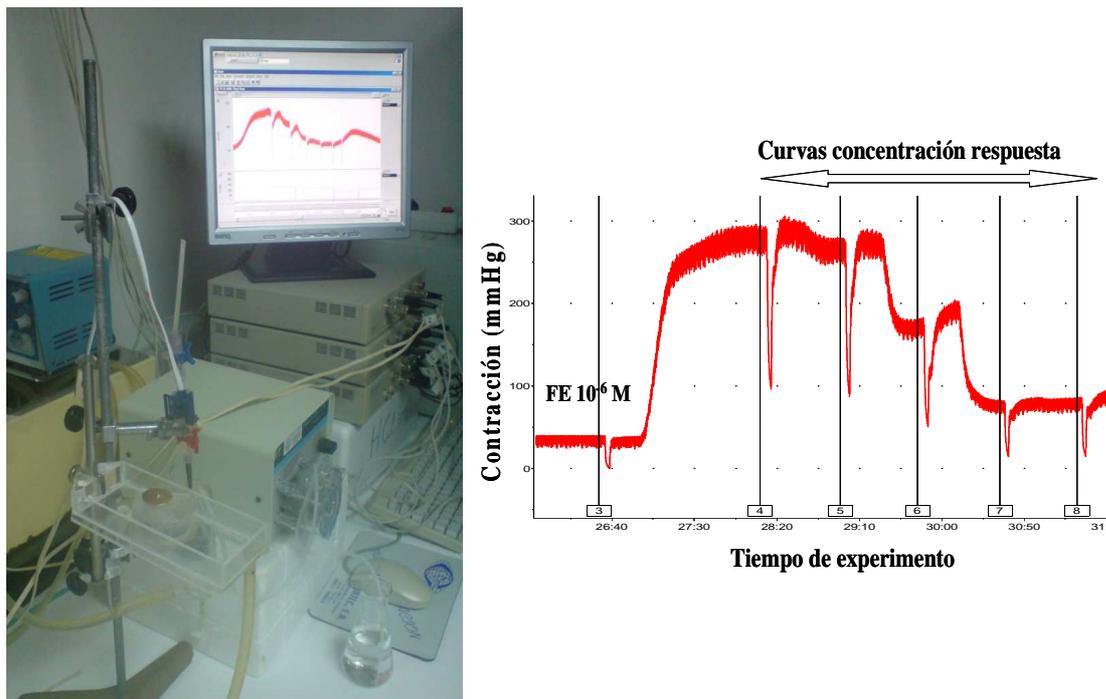
Tras otros 15 minutos de estabilización perfundiendo Krebs, se realizan curvas concentración-respuesta a ACh en preparaciones precontraídas con FE ( $10^{-6}$  M). Para ello se va perfundiendo sucesivamente disoluciones de FE a las que se ha incorporado concentraciones crecientes de ACh ( $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M). Después de un periodo de estabilización de 30 minutos, se repite el mismo protocolo para realizar una curva concentración respuesta a NTP ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M), y al final, después de un nuevo periodo de estabilización se realiza una curva de FE ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M).

#### Expresión y análisis de los resultados

La presión de perfusión basal y las respuestas a KCl y FE se expresan en mmHg. La relajación provocada por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. En todas las curvas concentración-respuesta se obtuvo el valor  $E_{max}$  y  $pD_2$  como se indicó anteriormente.

## 82 Metodología y resultados

Los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 4 experimentos. El análisis estadístico se obtiene como se indicó en el apartado 4.1.



**Figura 30.-** Sistema de perfusión y registro original de una curva dosis respuesta a ACh en lecho vascular renal.

## Resultados

Los valores de presión basal de perfusión en las ratas SHR de 12 semanas y WKY fueron similares mientras que en las ratas SHR de 24 semanas fueron inferiores. La respuesta a KCl (80 mM) y a FE ( $10^{-6}$  M) se incrementó con la edad, las ratas WKY respondieron mucho menos a estos agentes contracturantes que las ratas SHR de 12 semanas. Éstas, a su vez, respondieron menos que las ratas SHR de 24 semanas (Tabla 6).

Como se puede observar en la figura 31a, tras un periodo de 4 semanas de tratamiento con pravastatina, en las ratas SHR de 24 semanas se ven diferencias en la relajación a ACh entre el grupo control y el grupo tratado, donde la respuesta vasodilatadora fue significativamente mayor en las arterias renales procedentes de ratas tratadas, indicativo de una mejor funcionalidad endotelial.

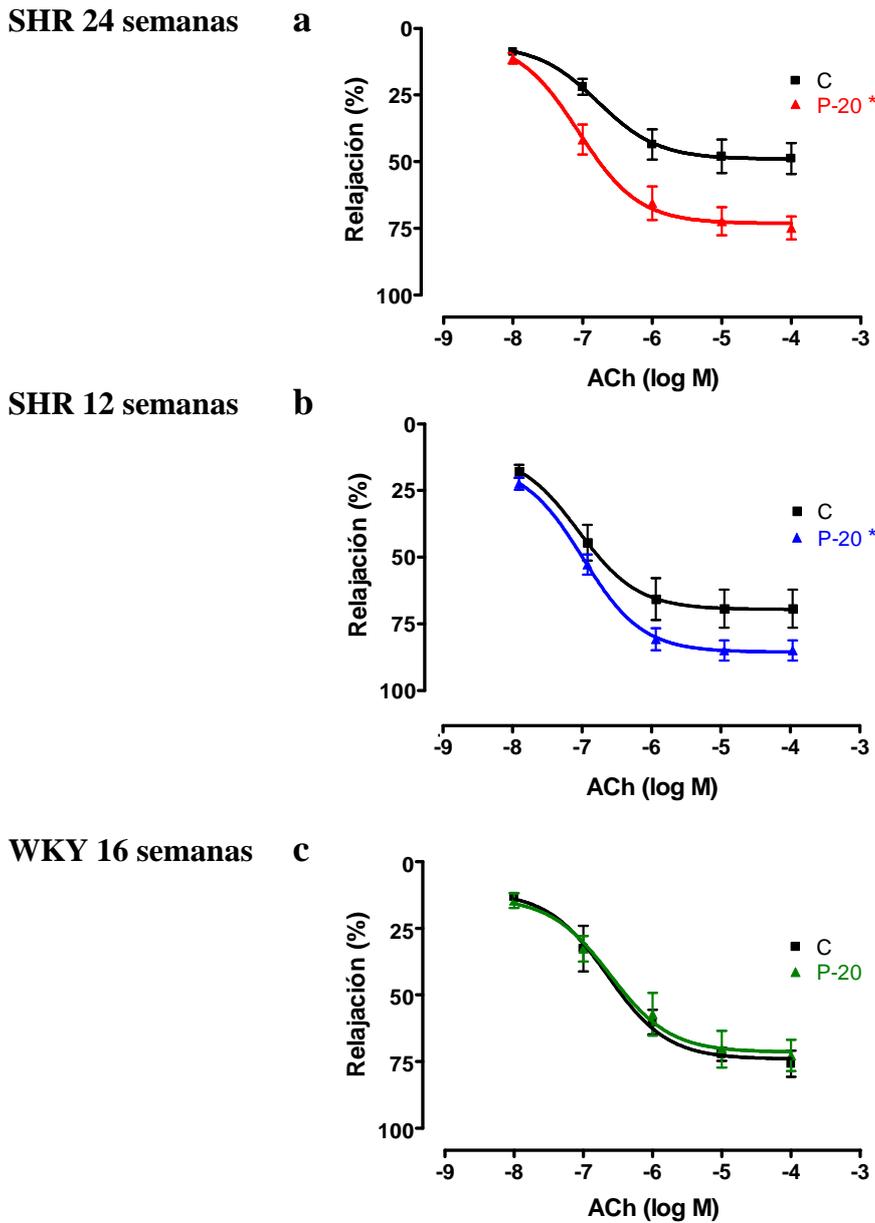
La relajación máxima de este lecho vascular en las ratas de 12 semanas fue superior a la respuesta máxima en las ratas de más edad (Tabla 7A). En este grupo de ratas más jóvenes el tratamiento con pravastatina mejoró también la respuesta a ACh (Figura 31b). En ambos grupos de SHR las ratas tratadas alcanzaron los valores de  $E_{max}$  de las ratas WKY (Tabla 7A). En la figura 31c observamos que el tratamiento con pravastatina no modificó la respuesta relajante a ACh en las ratas WKY.

Los resultados obtenidos con NTP indican que no hay diferencias en la capacidad relajante del músculo liso vascular entre SHR y WKY (Tabla 7B). Tampoco se observaron diferencias entre los animales tratados y sin tratar (Figura 32).

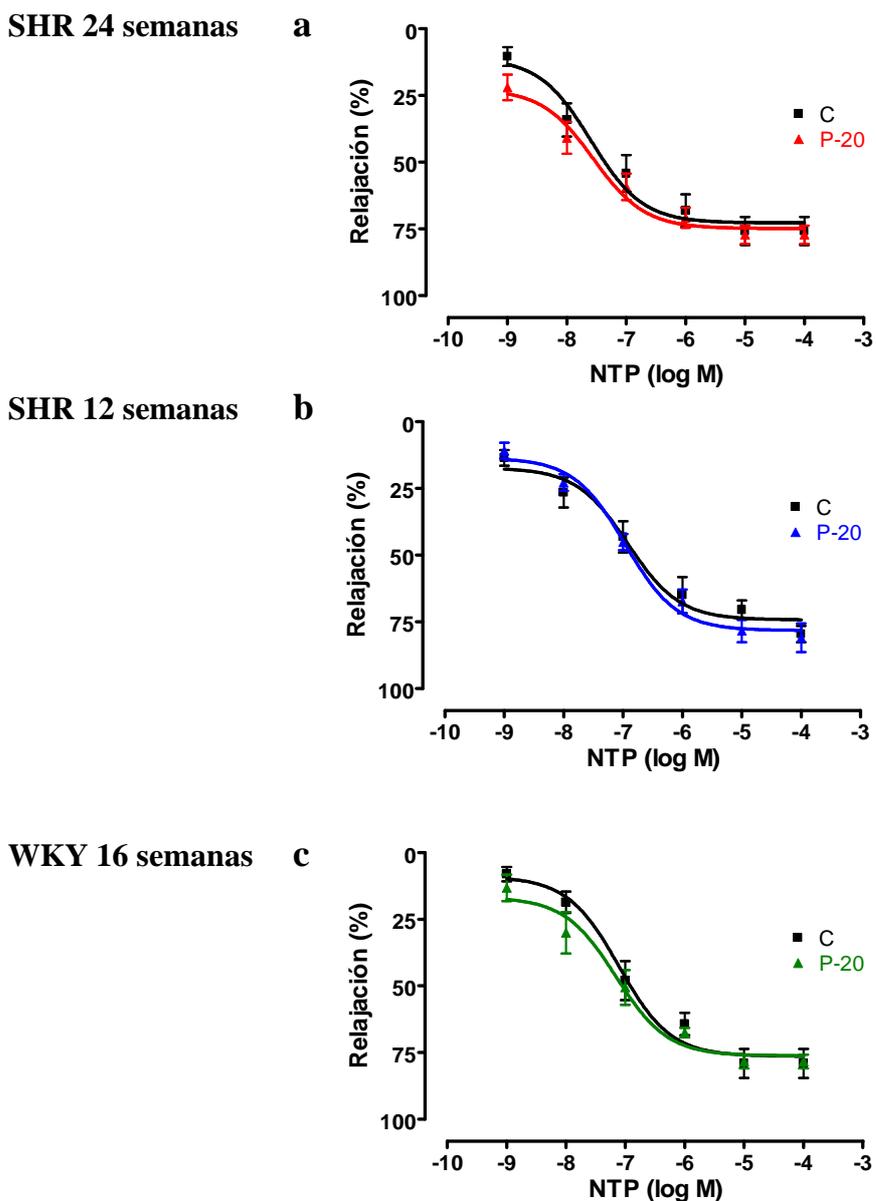
Los ensayos llevados a cabo con FE muestran respuestas contracturantes muy similares en todos los grupos estudiados (Figura 33).

	<b>P<sub>b</sub> (mmHg)</b>	<b>K<sub>80</sub> (mmHg)</b>	<b>FE (10<sup>-6</sup> M, mmHg)</b>
<b>SHR 24 semanas (n=6-8)</b>	28,1±1,5 <sup>♦</sup> <sup>^</sup>	235,5±10,7 <sup>♦</sup> <sup>^</sup>	243,6±9,3 <sup>♦</sup> <sup>^</sup>
<b>SHR 12 semanas (n=4-6)</b>	49,0±2,3	183,6±9,5 <sup>♦</sup>	206,9±14,5 <sup>♦</sup>
<b>WKY 16 semanas (n=4)</b>	42,4±9,7	134,6±8,7	149,2±25,7

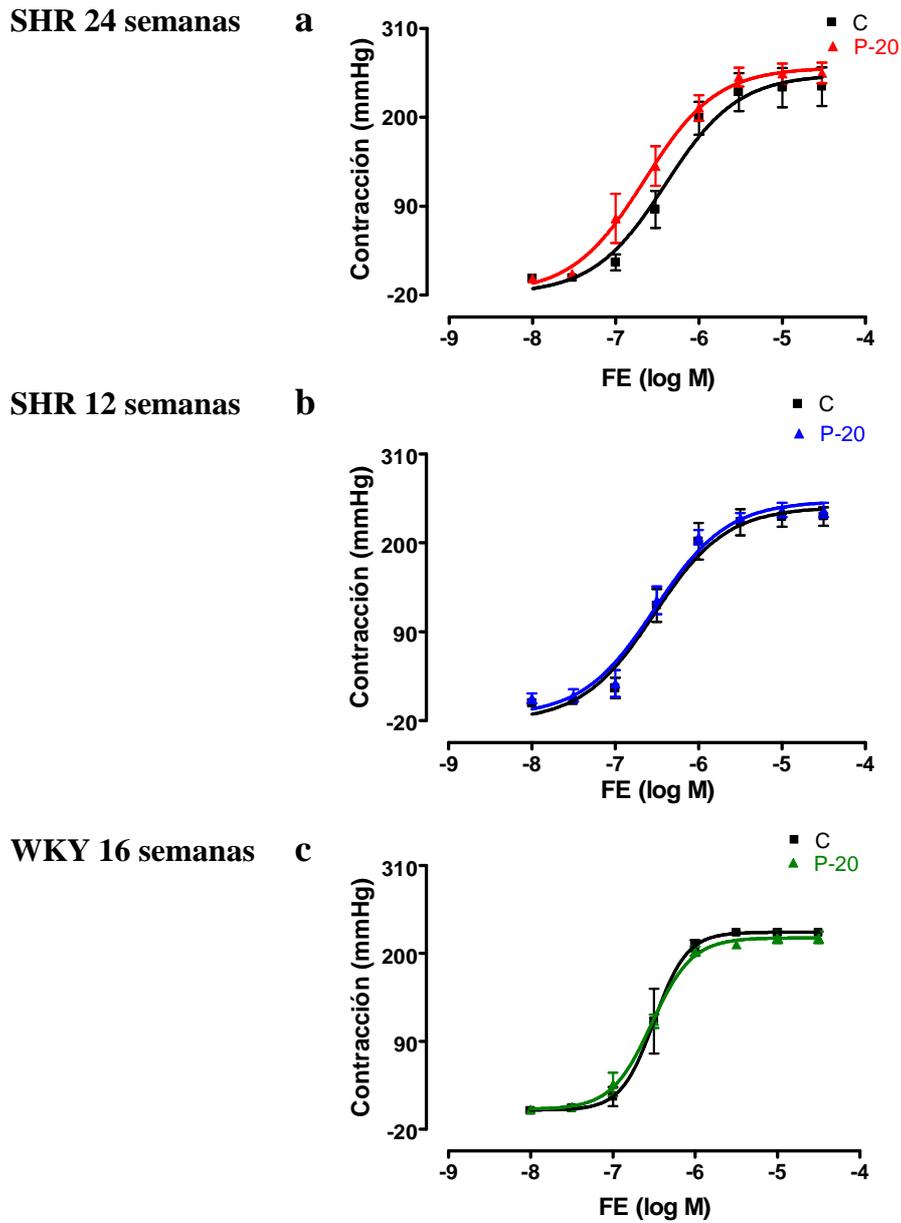
**Tabla 6.-** Valores de presión basal de perfusión (P<sub>b</sub>), respuesta a KCl (K<sub>80</sub>, 80 mM) y a fenilefrina (FE, 10<sup>-6</sup> M) en riñones perfundidos de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24, 12 semanas y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas. ♦p<0,05 frente al grupo control WKY, ^p<0,05 frente al grupo SHR de 12 semanas.



**Figura 31.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  M) en riñón perfundido y precontraído con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.



**Figura 32.-** Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) en riñón perfundido y precontraído con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.



**Figura 33.-** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en riñón perfundido de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.

Acetilcolina A	C		P-20	
	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
SHR 24 semanas (n=6-8)	48,8±5,8 <sup>♦^</sup>	6,7±0,3	74,9±4,3 <sup>*</sup>	7,0±3,1
SHR 12 semanas (n=4-6)	69,2±7,2 <sup>♦</sup>	7,2±0,2	85,1±3,8 <sup>*</sup>	7,1±0,1
WKY 16 semanas (n=4)	75,8±4,8	7,7±0,2	72,7±5,8	7,6±0,2

Nitroprusiato sódico B	C		P-20	
	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
SHR 24 semanas (n=7-9)	75,9±5,6	6,7±0,2	77,2±3,4	6,6±0,2
SHR 12 semanas (n=4-7)	79,6±3,0	6,9±0,2	80,9±5,3	6,7±0,1
WKY 16 semanas (n=4)	79,0±5,4	6,1±0,2	78,3±2,5	6,2±0,2

Fenilefrina C	C		P-20	
	E <sub>max</sub> (mmHg)	pD <sub>2</sub>	E <sub>max</sub> (mmHg)	pD <sub>2</sub>
SHR 24 semanas (n=7-8)	237,8±23,8	6,4±0,1	255,0±12,9	6,6±0,1
SHR 12 semanas (n=4-7)	232,7±11,4	6,5±0,1	240,5±8,8	6,5±0,1
WKY 16 semanas (n=4)	226,0±1,7	6,5±0,1	220,0±7,2	6,5±0,0

**Tabla 7.-** Valores de respuesta máxima (E<sub>max</sub>) y pD<sub>2</sub> de las curvas concentración respuesta acetilcolina (A), nitroprusiato sódico (B) y fenilefrina (C) en riñón perfundido de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24, 12 semanas y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*p<0,05 frente al grupo control, ♦p<0,05 frente al grupo control WKY, ^p<0,05 frente al grupo control SHR de 12 semanas.

## **5.- ESTUDIOS MORFO-HISTOLÓGICOS EN CORAZÓN**

### **5.1.- Hipertrofia**

Cuando finaliza el tratamiento, los corazones, extraídos inmediatamente después del sacrificio, se colocan en Krebs a temperatura ambiente, aireado con carbógeno. Se eliminan cuidadosamente los restos de tejido graso, se separan las aurículas, se diseccionan el ventrículo derecho y el izquierdo dejando el septum intraventricular como parte del ventrículo izquierdo. Sobre un papel de filtro se elimina el exceso de líquido y se pesa. La relación entre el peso del ventrículo izquierdo y el peso corporal se utiliza como índice de hipertrofia cardiaca.

### **5.2.- Área cardiomiocitos y fibrosis**

Una sección transversal del corazón se fija en formol tamponado al 4%. Posteriormente, se realiza la inclusión en parafina sintética mediante el uso de un procesador automático de tejidos (Shandon-Elliot modelo Bench SCE 0400, EE.UU.), con un programa de cambio de alcoholes que se efectúa de manera automática. Una vez concluido este proceso se obtienen bloques a partir de los cuales se cortan secciones de 4-5  $\mu\text{m}$  que se tiñen con rojo sirio. Estos cortes se observan al microscopio óptico (Olympus BX50, Japón) y las imágenes se captan mediante una cámara de alta resolución (Olympus DP50, Japón). Las imágenes tomadas con un objetivo de 20X se utilizan para la determinación del tamaño de los cardiomiocitos y con un objetivo 40X para la determinación de la fibrosis intersticial.

El área de cada cardiomiocito se mide utilizando el software Scion Image 4.2 para Windows (desarrollado por US National Institutes of Health y disponible en <http://rbs.info.nih.gov/nih-image/>). Se toman nueve secciones diferentes del ventrículo izquierdo, calculando el área como un promedio de 30 miocitos de cada corazón. El área de cada cardiomiocito se expresa en  $\mu\text{m}^2$ .

En los cortes teñidos con rojo sirio el colágeno aparece de color rojo. Para determinar el colágeno intersticial utilizamos el programa Adobe Photoshop CS2 (Microsoft). Se contabilizan los píxeles que ocupa el área de fibrosis y los que ocupa la imagen completa de un mínimo de 8 imágenes por corte.

## 90 Metodología y resultados

Además, en muestras de corazón, congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se determina por western blotting algunas proteínas relacionadas con los procesos fibróticos como colágeno-I, fibronectina y PAI-1. El procedimiento es similar al indicado en el apartado 4.2. con ligeras modificaciones. Para la transferencia se utiliza una membrana de PVDF (BioTrace PVDF  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ; Pall Gelman, EE.UU.), el bloqueo de las membranas se hace con BSA (1-3%) en tampón de lavado (0,1% Tween-20; NaCl 150 mM; Tris 20 mM, pH 7,5) y la incubación fue de 90 minutos a temperatura ambiente. La detección de las bandas proteicas y su estimación cuantitativa se realiza por densitometría según los métodos especificados para la determinación de la eNOS y COX-2.

### **Expresión y análisis de los resultados**

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 3 muestras. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba “*t*” de Student para datos no pareados o el ANOVA de una vía seguido de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

En la figura 34 se observa que tras un periodo de tratamiento de 4 semanas con pravastatina se redujo de forma significativa la hipertrofia cardiaca, tanto en ratas SHR de 24 semanas como en las de 12 semanas, mientras que en las ratas WKY no hubo diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado.

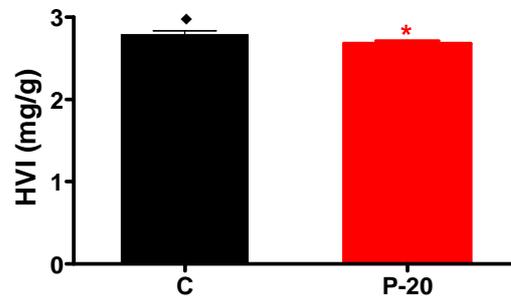
Comparando los dos grupos control de ratas SHR se vio que en las más viejas el índice de hipertrofia era ligeramente superior ( $2,79 \pm 0,05$  frente a  $2,70 \pm 0,03$  mg/g), aunque la diferencia no era significativa. Sí se observaron diferencias entre cualquiera de estos grupos hipertensos y el grupo WKY control que mostró un índice significativamente menor ( $1,77 \pm 0,04$  mg/g).

En las figuras 35 y 37 podemos observar las diferencias en la cantidad de colágeno entre los diferentes grupos del estudio. Tras el periodo de tratamiento, la cuantificación de la fibrosis a nivel intersticial mostró una reducción en las ratas tratadas con pravastatina en todos los grupos.

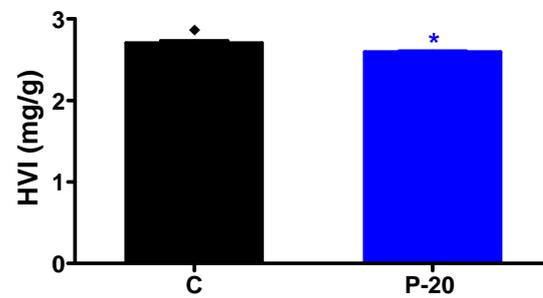
El análisis del tamaño de los cardiomiocitos nos indicó un incremento significativo del área de estas células en las ratas SHR respecto a las ratas WKY. Además, la edad de las ratas SHR también resultó un factor implicado en el grado de hipertrofia, pues observamos un valor significativamente mayor en el área de los cardiomiocitos de los corazones de ratas SHR control de 24 semanas que en el de los animales de 12 semanas (Figura 36). El tratamiento con pravastatina redujo el área de los cardiomiocitos de ratas SHR tanto en las de 24 como en las de 12 semanas (Figura 36a y 36b), pero no modificó este parámetro en las ratas WKY (Figura 36c).

Como se puede ver en las figuras 38, 39 y 40 la expresión de colágeno-I, fibronectina y PAI-1 se redujo en las ratas tratadas SHR de 12 semanas, mientras que en las ratas SHR de 24 semanas el efecto sólo se observó para el colágeno-I y PAI-1. El tratamiento no modificó ninguno de estos parámetros en las ratas WKY. En todos los casos la expresión de  $\alpha$ -tubulina no mostró diferencias.

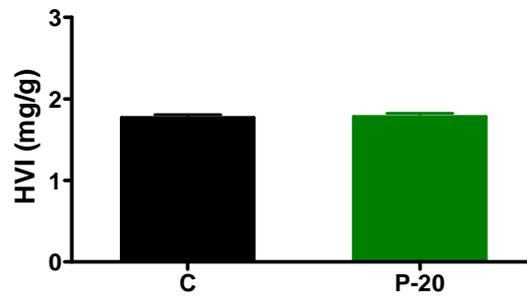
SHR 24 semanas **a**



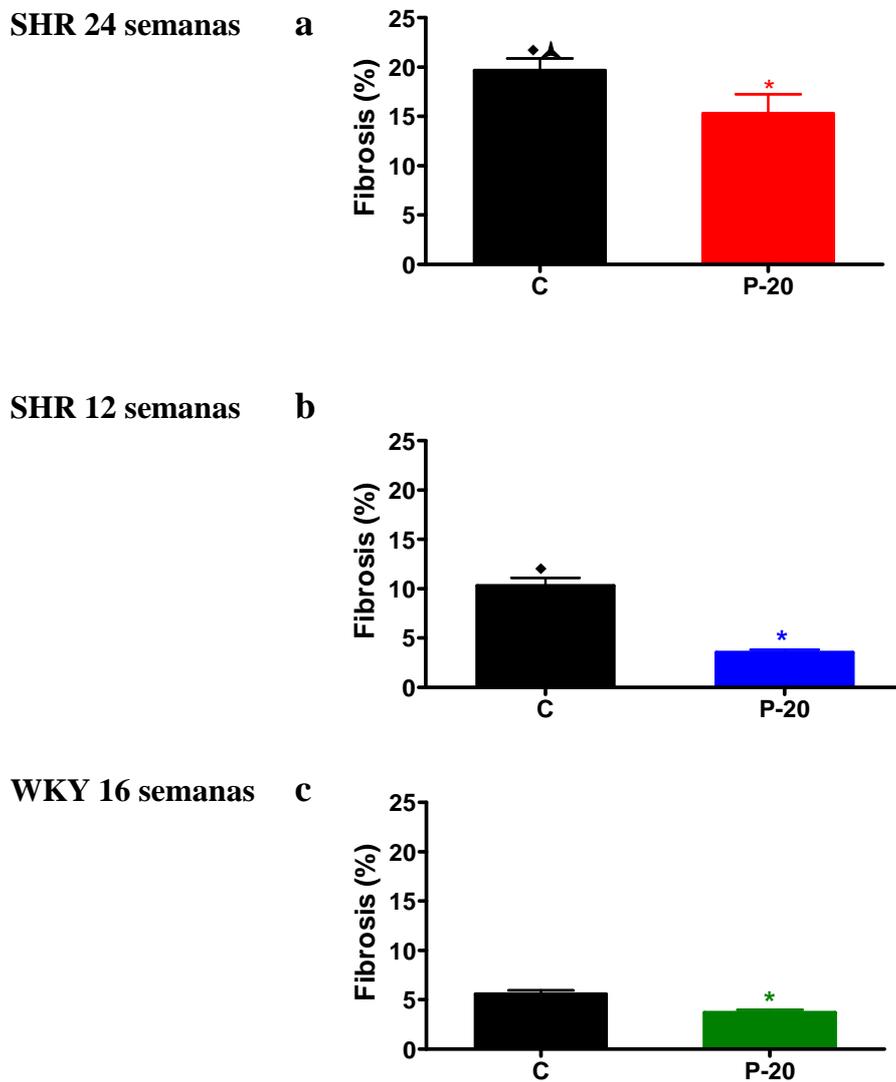
SHR 12 semanas **b**



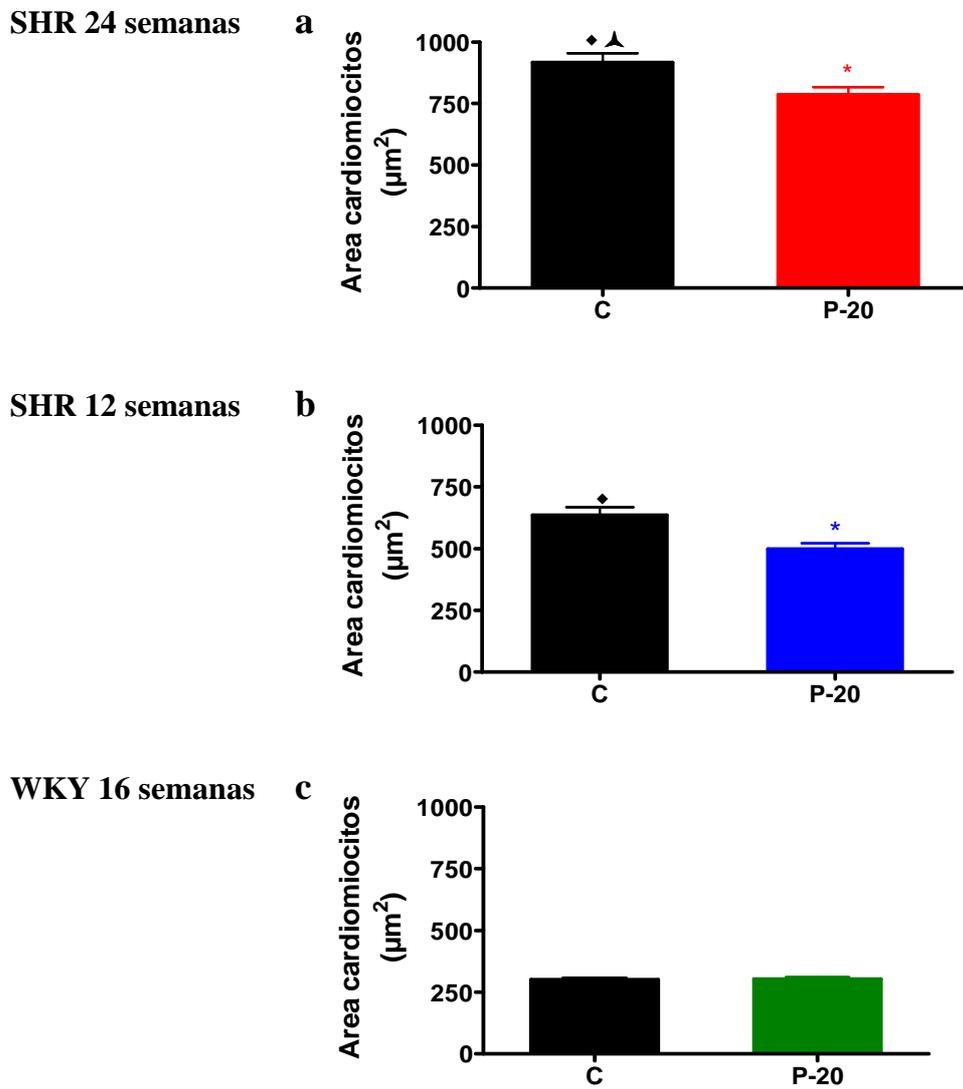
WKY 16 semanas **c**



**Figura 34.-** Índice de hipertrofia cardíaca (HVI) en ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control,  $\blacklozenge p < 0,05$  frente al grupo control WKY.

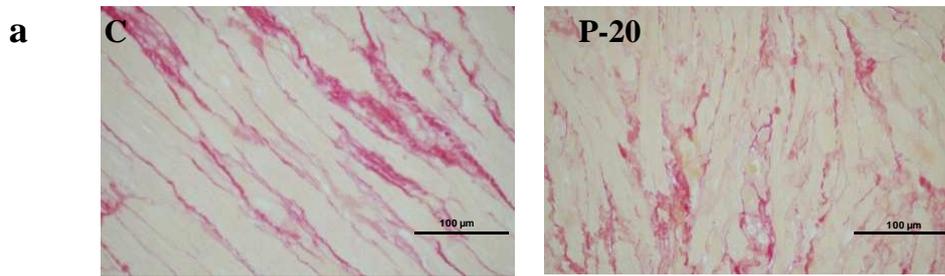


**Figura 35.-** Porcentaje de fibrosis intersticial en ventrículo izquierdo de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*p<0,05 frente al grupo control, ♦p<0,05 frente al grupo control WKY, ^p<0,05 frente al grupo control SHR de 12 semanas.

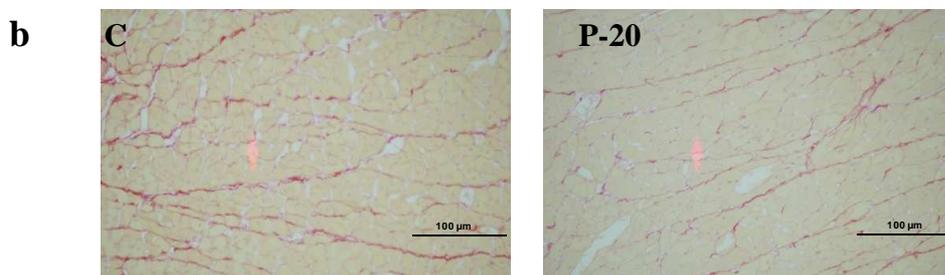


**Figura 36.-** Área de los cardiomiocitos de corazones de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control,  $\blacklozenge p < 0,05$  frente al grupo control WKY,  $\blacktriangle p < 0,05$  frente al grupo control SHR 12 semanas.

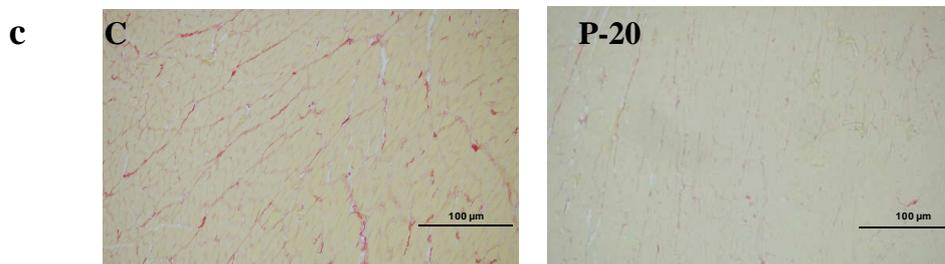
**SHR 24 semanas**



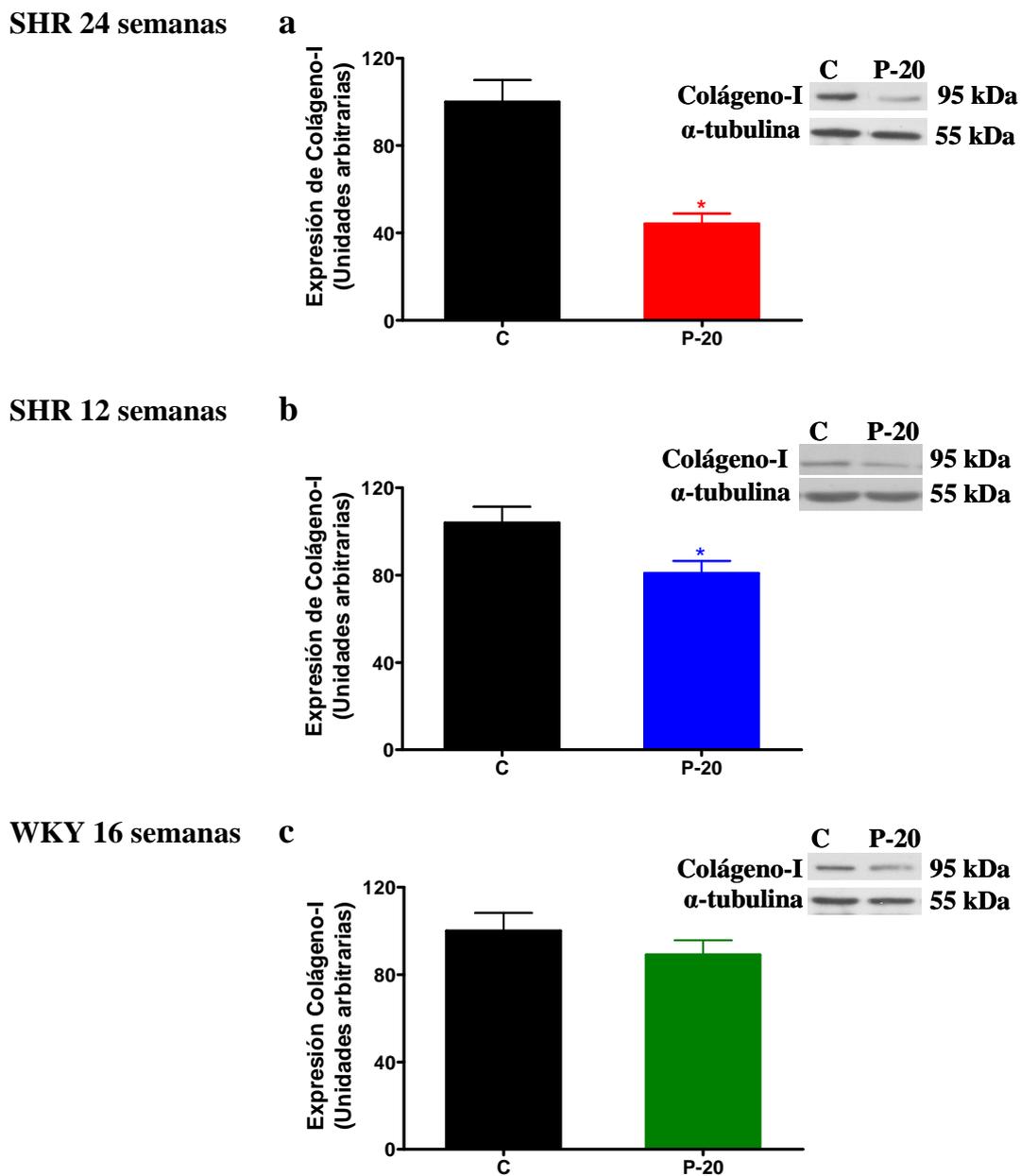
**SHR 12 semanas**



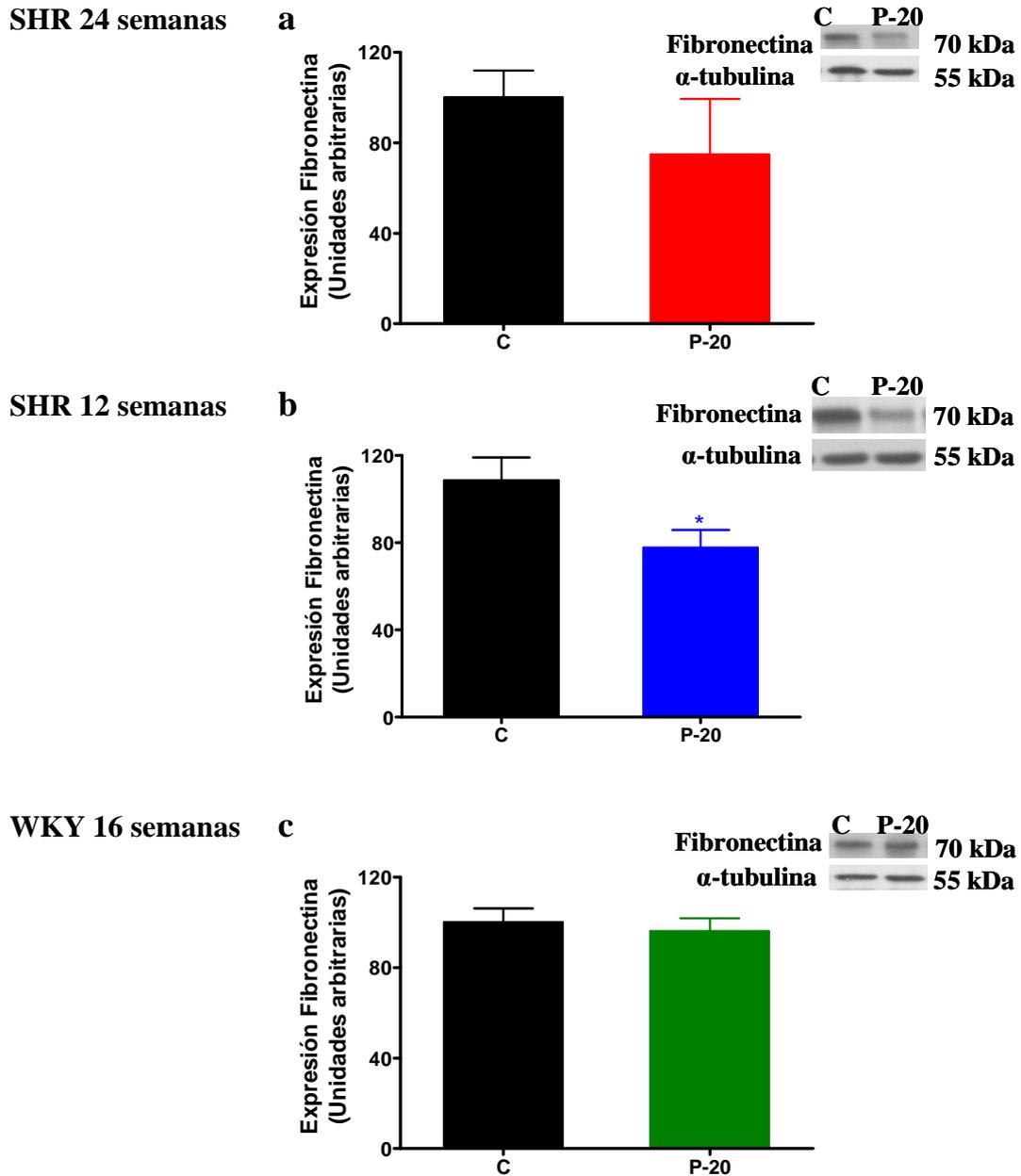
**WKY 16 semanas**



**Figura 37.-** Imágenes representativas de cortes histológicos, teñidos con rojo sirio, de ventrículo izquierdo de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.



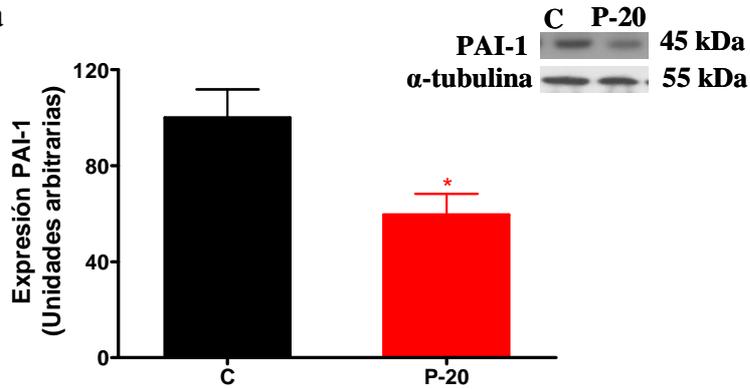
**Figura 38.-** Blots representativos y cuantificación densitométrica de la expresión de colágeno-I en el ventrículo izquierdo de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (b), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.



**Figura 39.-** Blots representativos y cuantificación densitométrica de la expresión de fibronectina en el ventrículo izquierdo de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (b), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control.

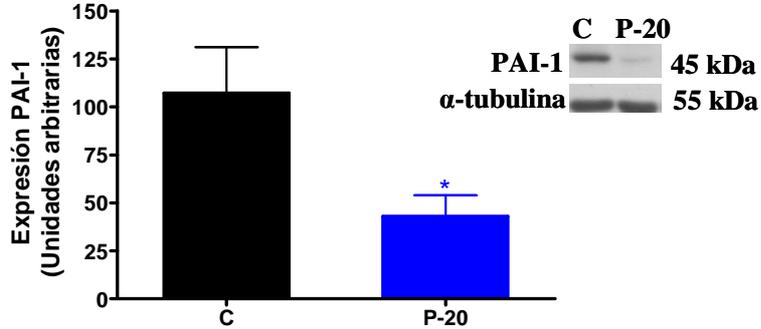
SHR 24 semanas

a



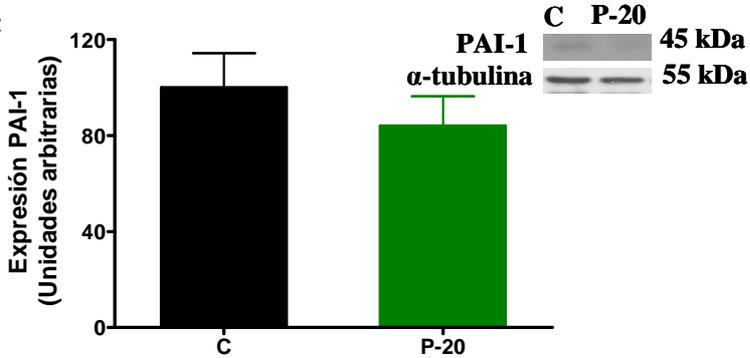
SHR 12 semanas

b



WKY 16 semanas

c



**Figura 40.-** Blots representativos y cuantificación densitométrica de la expresión de PAI-1 en el ventrículo izquierdo de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a), 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (b), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

## 6.- ESTUDIOS MORFO-HISTOLÓGICOS EN ARTERIAS

El estudio se realiza con arterias de conductancia (aorta) y de resistencia (lecho vascular renal). Las muestras, un anillo de aorta y la mitad del riñón derecho seccionado longitudinalmente en su eje dorso-ventral, se fijan en formol tamponado al 4%. Posteriormente, ambas muestras se procesan para la obtención de los cortes según el protocolo mencionado en el apartado 5.

Una vez realizada la tinción, los cortes se observan al microscopio óptico (Olympus BX50, Japón), ajustando el objetivo para cada muestra de modo que se obtenga una visión completa de los anillos de aorta y de las secciones transversales de las arterias renales. En este caso, se eligieron arterias intrarrenales de entre 20 y 50  $\mu\text{m}$  de diámetro externo. Las imágenes se captan con la ayuda de una cámara de alta resolución (Olympus DP50, Japón) adaptada al sistema y posteriormente, utilizando el software Scion Image 4.2 se miden los siguientes parámetros:

**$P_i$** : perímetro interno que delimita el lumen del vaso

**$P_e$** : perímetro externo que delimita el margen exterior de la capa media

**$A_i$** : área interna, área del lumen del vaso

**$A_e$** : área externa, área delimitada por el margen exterior de la capa media

Cada medida se realiza por duplicado por un mismo observador, dando como valor de medida la media de ambos valores. A partir de estos valores se calculan los siguientes parámetros morfométricos:

**$R_i$** : radio interno.  **$P_i=2\pi R_i$**

**$R_e$** : radio externo.  **$P_e=2\pi R_e$**

**$CSA_m$** : área seccional de la capa media.  **$CSA_m=(A_e-A_i)$**

**$L$** : lumen del vaso.  **$L=(2 \times R_i)$**

**$W_m$** : grosor de la capa media.  **$W_m=(R_e-R_i)$**

**$W_m/L$** : relación entre el grosor de la capa media y el lumen del vaso

## **Expresión y análisis de los resultados**

Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  EEM de 60 arterias captadas de 3 riñones para las arterias intrarrenales y de secciones de 4-6 aortas. Los resultados para el lumen y el grosor de la capa media se expresan en  $\mu\text{m}$  y para el área seccional de la capa media en  $\text{mm}^2$  en las aortas y en  $\mu\text{m}^2$  en las arterias intrarrenales. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba “*t*” de Student para datos no pareados, o el ANOVA de un vía seguido de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Morfometría de arteria aorta**

Como puede observarse en la tabla 8 y la figura 42, en las ratas SHR de 24 semanas el grosor de la pared y el área de la capa media eran más grandes que en las ratas SHR de 12 semanas. En las ratas normotensas el grosor de la pared era aún menor.

En las ratas de 24 semanas tratadas con pravastatina se produjo una disminución significativa del grosor de la pared y del área seccional de la capa media sin que existieran diferencias en el lumen del vaso. En la figura 41a podemos apreciar que todos estos cambios dieron como resultado una disminución significativa de la relación W/L. Algo similar ocurrió en las ratas de 12 semanas tratadas aunque en este grupo también se produjo un incremento significativo del lumen (Figura 41b, Tabla 8).

El tratamiento con pravastatina no provocó cambios en estos parámetros en ratas WKY (Figura 41c, Tabla 8).

### **Morfometría de arterias intrarrenales**

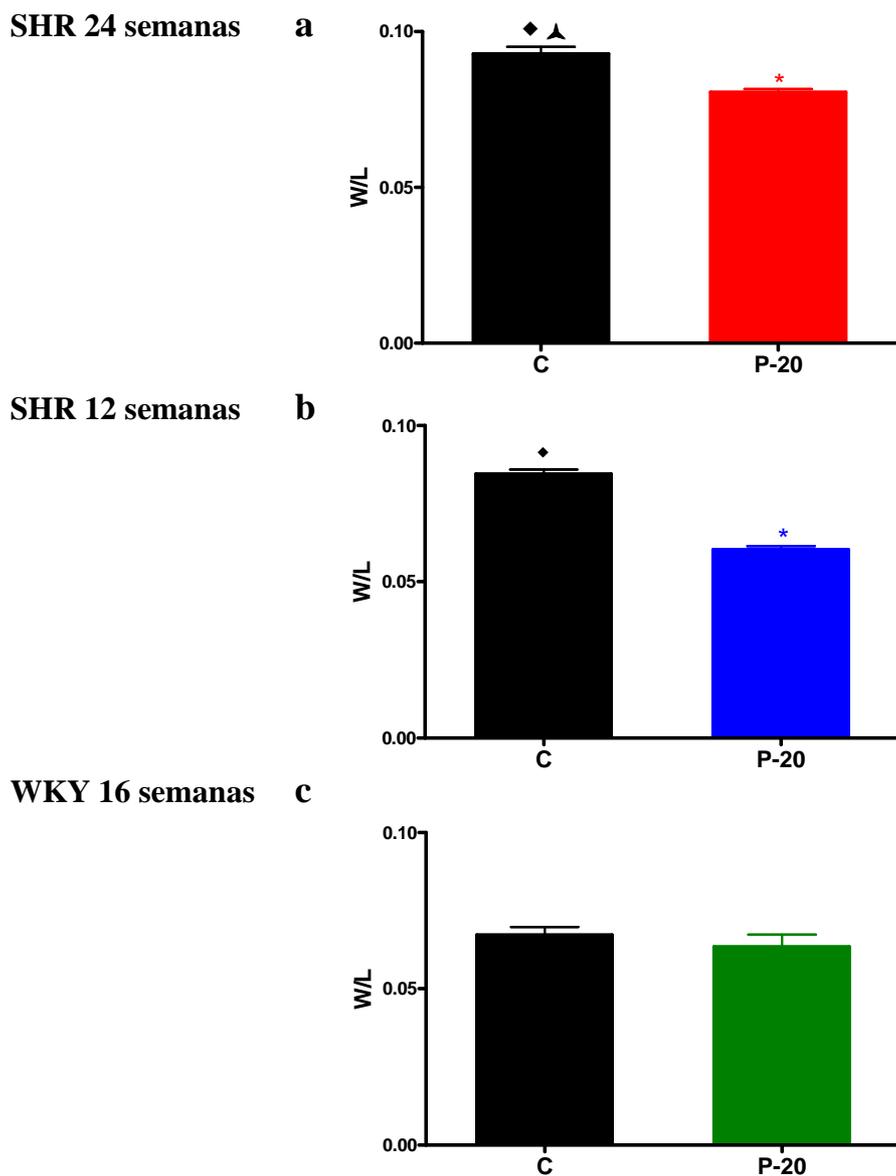
La edad de las ratas SHR no afectó de forma significativa a los diferentes parámetros evaluados en estas arterias de resistencia. Sí encontramos diferencias entre ratas WKY y ratas SHR en el lumen y el grosor de la pared pero no en el área

seccional de la capa media (Tabla 9). El tratamiento incrementó significativamente el lumen y disminuyó significativamente el  $W_m$  y el CSA en las ratas SHR de 24 semanas pero no modificó ninguno de estos parámetros ni en ratas SHR de 12 semanas ni en las ratas WKY (Figura 44).

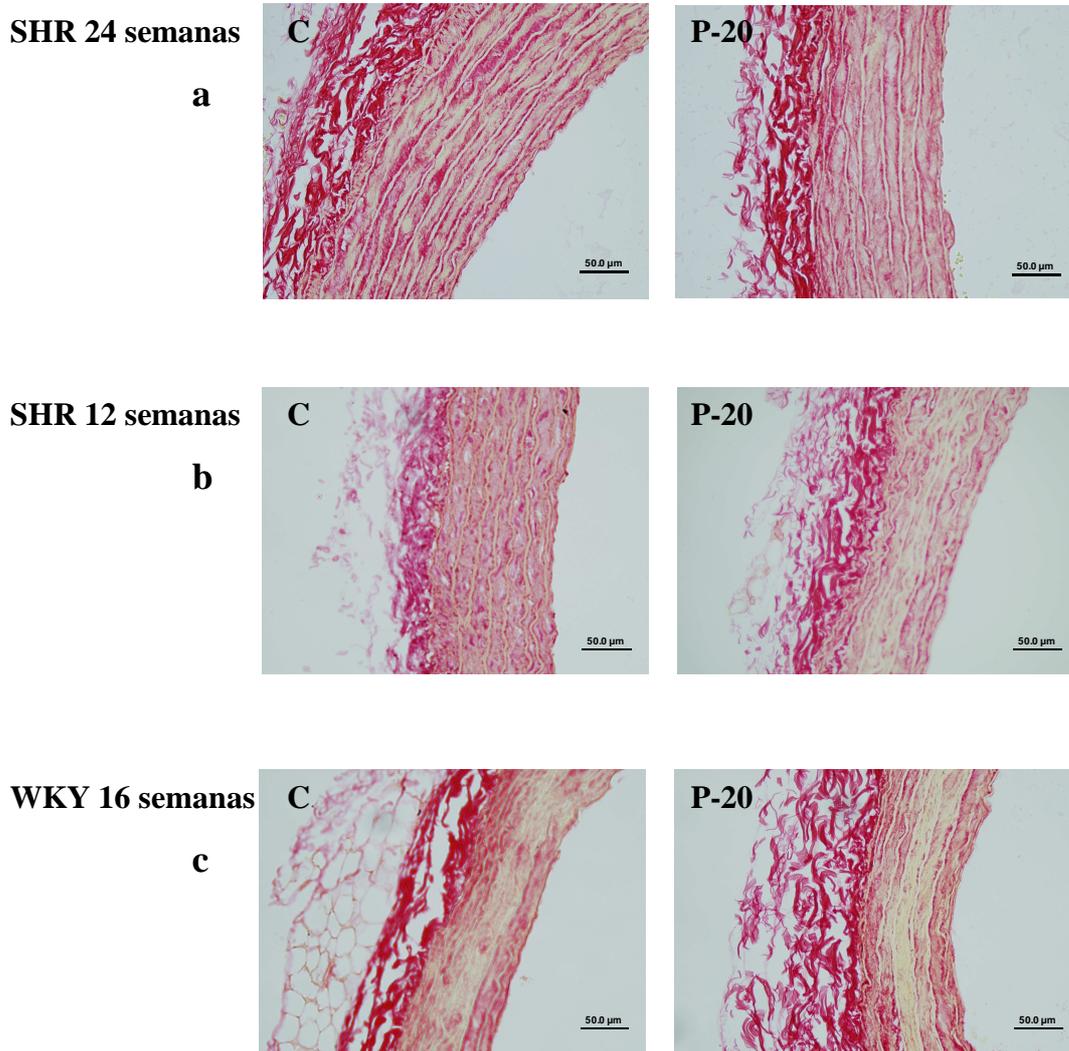
En la figura 43 podemos observar la relación W/L, este índice, que era mayor en SHR que en WKY, disminuyó de forma significativa únicamente cuando las ratas SHR tenían más edad.

	<b>L (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>W (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>CSA (<math>\text{mm}^2</math>)</b>
<b>SHR 24 semanas</b>			
<b>C (n=6)</b>	1700 $\pm$ 7 $\blacklozenge^{\blacktriangle}$	157,6 $\pm$ 4,1 $\blacklozenge^{\blacktriangle}$	0,92 $\pm$ 0,02 $\blacklozenge^{\blacktriangle}$
<b>P-20 (n=6)</b>	1687 $\pm$ 18	135,9 $\pm$ 2,2 $^*$	0,78 $\pm$ 0,01 $^*$
<b>SHR 12 semanas</b>			
<b>C (n=6)</b>	1419 $\pm$ 8 $\blacklozenge$	119,8 $\pm$ 2,4 $\blacklozenge$	0,61 $\pm$ 0,01 $\blacklozenge$
<b>P-20 (n=6)</b>	1553 $\pm$ 8 $^*$	93,4 $\pm$ 1,5 $^*$	0,50 $\pm$ 0,01 $^*$
<b>WKY 16 semanas</b>			
<b>C (n=4)</b>	1560 $\pm$ 38	104,6 $\pm$ 1,2	0,57 $\pm$ 0,02
<b>P-20 (n=4)</b>	1670 $\pm$ 42	105,5 $\pm$ 2,5	0,56 $\pm$ 0,01

**Tabla 8.-** Parámetros morfométricos de arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24, 12 semanas, y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas, control (C) y tratadas con pravastatina 20 mg/Kg/día (P-20) durante 4 semanas. **L**= lumen, **W**=grosor de la capa media y **CSA**= área seccional de la capa media.  $^*$ P<0,05 frente al grupo control,  $\blacklozenge$ p<0,05 frente al grupo control WKY,  $\blacktriangle$ p<0,05 frente al grupo control SHR 12 semanas.



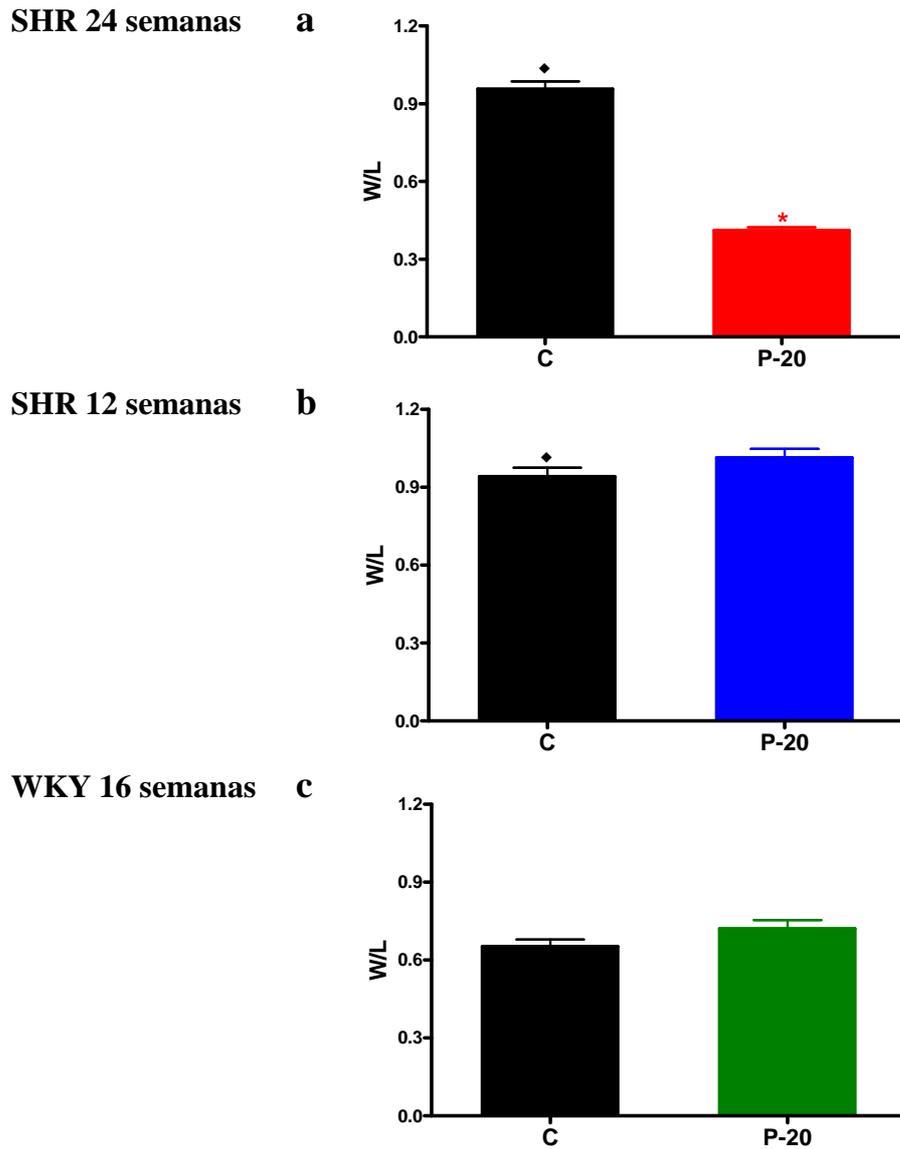
**Figura 41.-** Relación entre el grosor de la capa media (W) y el lumen del vaso (L) en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (a) 12 semanas (b) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (c), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*p<0,05 frente al grupo control, ♦p<0,05 frente al grupo control WKY, ^p<0,05 frente al grupo SHR 12 semanas.



**Figura 42.-** Imágenes representativas de cortes histológicos, teñidos con rojo sirio, de secciones transversales de arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.

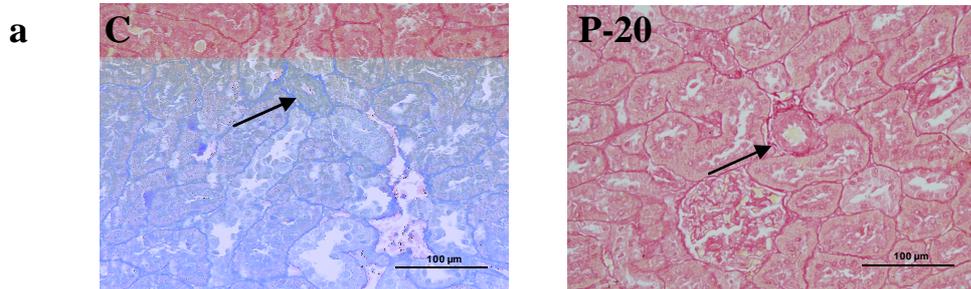
	<b>L (μm)</b>	<b>W (μm)</b>	<b>CSA (μm<sup>2</sup>)</b>
<b>SHR 24 semanas</b>			
<b>C (n=3)</b>	12,9±0,4 <sup>♦</sup>	11,2±0,2 <sup>♦</sup>	734,4±29,6
<b>P-20 (n=3)</b>	20,2±0,5 <sup>*</sup>	7,6±0,2 <sup>*</sup>	613,7±25,9 <sup>*</sup>
<b>SHR 12 semanas</b>			
<b>C (n=3)</b>	13,3±0,4 <sup>♦</sup>	11,3±0,2 <sup>♦</sup>	748,6±30,5
<b>P-20 (n=3)</b>	12,6±0,4	11,6±0,2	784,8±29,5
<b>WKY 16 semanas</b>			
<b>C (n=3)</b>	16,2±0,1	9,3±0,2	676,2±28,9
<b>P-20 (n=3)</b>	15,1±0,5	9,8±0,3	704,5±24,4

**Tabla 9.-** Parámetros morfométricos de arterias intrarrenales de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 y 12 semanas y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. **W**=grosor de la capa media, **CSA**= área seccional de la capa media y **L**= lumen. <sup>\*</sup>p<0,05 frente al grupo control, <sup>♦</sup>p<0,05 frente al grupo control WKY.

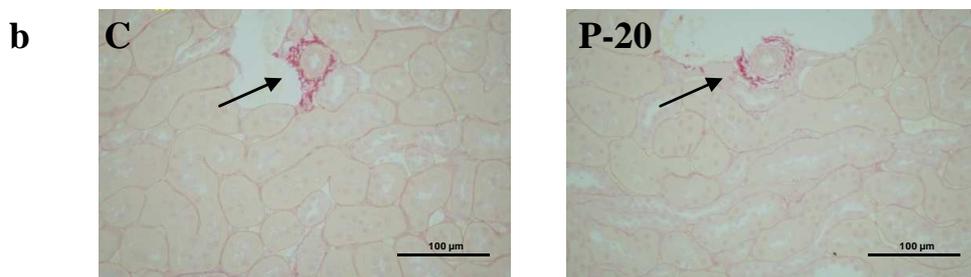


**Figura 43.-** Relación entre el grosor de la capa media (W) y el lumen del vaso (L) en arterias intrarrenales de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control, ♦ $p < 0,05$  frente al grupo control WKY.

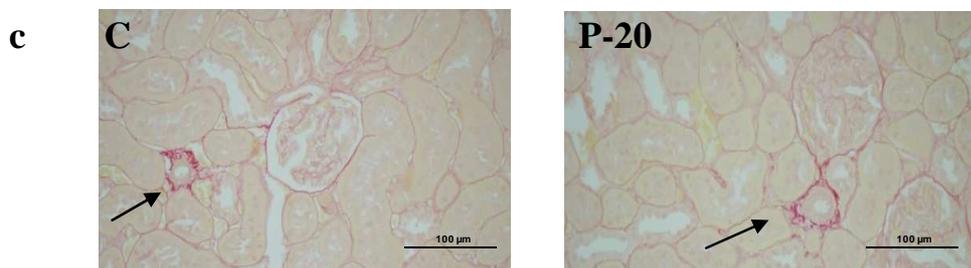
**SHR 24 semanas**



**SHR 12 semanas**



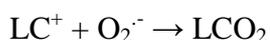
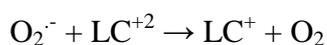
**WKY 16 semanas**



**Figura 44.-** Imágenes representativas de cortes histológicos, teñidos con rojo sirio, de secciones transversales de riñones de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. Las flechas indican las arterias intrarrenales.

## 7.- DETERMINACIÓN DEL ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido se puede cuantificar mediante quimioluminiscencia con lucigenina (Luc), este método se basa en la formación de un catión de lucigenina ( $\text{Luc}^+$ ) en presencia de  $\text{O}_2^-$ , a partir del cual se forma un dioxetano de lucigenina ( $\text{LCO}_2$ ) también en presencia del  $\text{O}_2^-$ ; posteriormente para estabilizar la lucigenina, el dioxetano cede su energía en forma de ondas electromagnéticas que pueden medirse por un fotoamplificador y un fotodetector, de acuerdo a las siguientes reacciones:



La principal fuente de producción de  $\text{O}_2^-$  en el sistema cardiovascular es la NADPH-oxidasa. Con el fin de determinar el efecto del tratamiento con pravastatina sobre la actividad de este enzima se llevó a cabo un ensayo en anillos de aorta. Los anillos se incuban en una solución tampón Krebs-HEPES, cuya composición es la siguiente: NaCl 119 mM; HEPES 20 mM;  $\text{MgSO}_4$  1,0 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,15 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 mM;  $\text{NaHCO}_3$  5,0 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,2 mM; glucosa 5,5mM, pH 7,4. La incubación se lleva a cabo a 37 °C, durante 30 minutos con aireación continua y en presencia de dietilditiocarbamato de amonio (DDC, 0,5 M) para inhibir la SOD. A continuación los anillos se colocan en un tubo especial para luminómetro que contiene tampón con lucigenina (5  $\mu\text{M}$ ) y se lee la luminiscencia en un luminómetro (LB-9507 LUMAT, Berthold Technologies, Alemania). Cada valor es el promedio de 10 medidas realizadas durante 30 segundos.

Se realizaron medidas de producción de  $\text{O}_2^-$  tanto en condiciones basales como estimuladas mediante la adición de NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) como sustrato de la NADPH-oxidasa. Una vez realizada la lectura se añade 4,5-dihidroxi-1,3-benceno ácido disulfónico (tirón, 1 M), que es capaz de eliminar  $\text{O}_2^-$ , con el fin de realizar una

segunda lectura y obtener por diferencia las unidades relativas de luminiscencia (URL) específicas de  $O_2^{\cdot-}$ . Terminado el experimento los anillos de aorta se secan y se pesan para posteriormente expresar los resultados como URL por unidad de tiempo con respecto al peso seco de los anillos (URL/min/mg).

### **Expresión y análisis de los resultados**

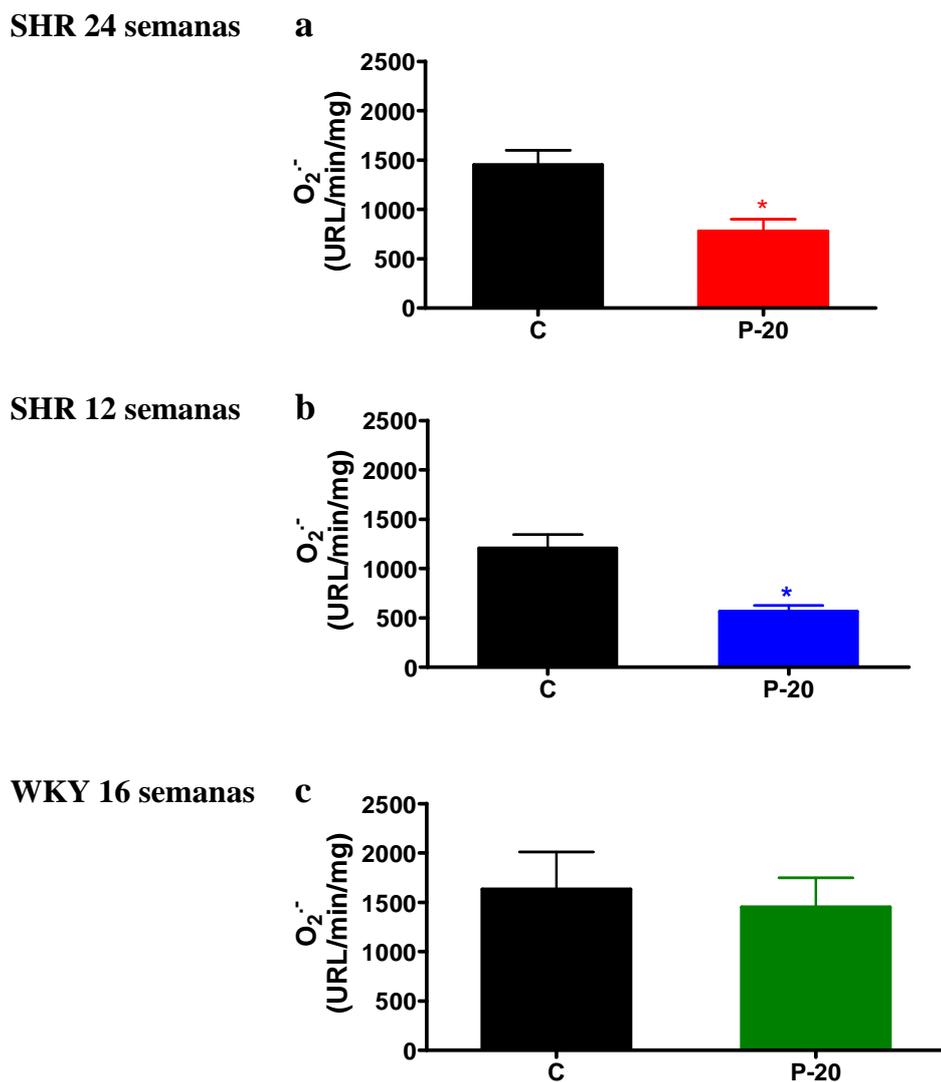
Los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 experimentos. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba “*t*” de Student para datos no pareados o el ANOVA de un vía seguido de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

La producción basal de  $O_2^{\cdot-}$  fue similar en los tres grupos control y no se vio afectada por el tratamiento con pravastatina (Tabla 10). Cuando NADPH (100  $\mu$ M) estaba presente en el medio la producción de  $O_2^{\cdot-}$  se incremento 30 veces respecto a la producción basal. La figura 45a muestra que en las ratas de 24 semanas tratadas con pravastatina la producción de  $O_2^{\cdot-}$  se redujo de manera significativa frente al grupo control. Resultados similares se encontraron también cuando tratamos ratas SHR de 12 semanas (Figura 45b). El tratamiento de ratas WKY no produjo reducción significativa de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Figura 45c).

	$O_2^{\cdot-}$ (URL/min/mg)	
	C	P-20
<b>SHR 24 semanas (n=7-11)</b>	53,9±5,1	45,3±1,7
<b>SHR 12 semanas (n=7-8)</b>	49,3±4,6	39,5±4,2
<b>WKY 16 semanas (n=4)</b>	76,4±9,8	61,1±12,9

**Tabla 10.-** Producción basal de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 y 12 semanas y ratas normotensas (WKY) de 16 semanas, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas.



**Figura 45.-** Producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) estimulada con NADPH (100  $\mu$ M) en aorta de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

## **8.- PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

En el organismo, como consecuencia del metabolismo celular, se producen radicales libres que pueden interaccionar con los lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. La determinación de la peroxidación lipídica se puede llevar a cabo por la medida de los aldehídos reactivos formados por la descomposición de los peróxidos lipídicos. El MDA es el aldehído más importante obtenido en dicha degradación, éste puede reaccionar, a pH ácido y alta temperatura, con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando un producto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente.

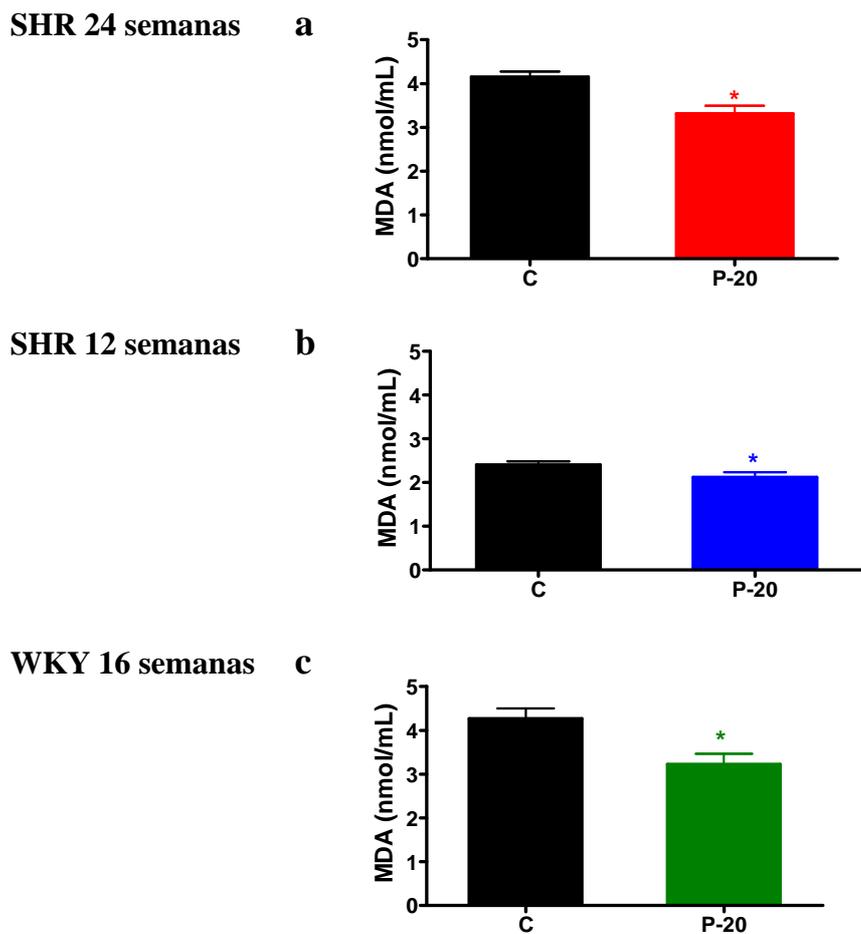
Con el fin de determinar si el tratamiento con pravastatina modifica el grado de peroxidación lipídica en las ratas, medimos la producción de MDA en plasma siguiendo el método de Ohkawa y cols. (Ohkawa et al., 1979). El procedimiento consiste en mezclar 500  $\mu\text{L}$  de plasma con 500  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico. A continuación se añaden 2 mL de una solución que contiene ácido tricloroacético al 15%, TBA al 0,37% y ácido clorhídrico 0,25 N. Después de incubar 30 minutos a 90 °C, se ponen las muestras en hielo durante 10 minutos para parar la reacción, se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 25 minutos y se recoge el sobrenadante para, finalmente, leer la absorbancia a 535 nm. El MDA se usa como patrón. Para calcular la concentración plasmática de MDA se utiliza su coeficiente de extinción molar ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

### **Expresión y análisis de los resultados**

La concentración plasmática de MDA se expresa en nmol/mL de plasma. Todos los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 experimentos. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba “t” de Student para datos no pareados o el ANOVA de un vía seguido de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Como se puede observar en la figura 46 el tratamiento con pravastatina durante 4 semanas redujo los niveles de MDA en plasma, tanto en ratas SHR de 24 y 12 semanas como en ratas WKY de 16 semanas.



**Figura 46.-** Niveles de malondialdehído (MDA) en plasma de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas (**a**), 12 semanas (**b**) y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (**c**), control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina durante 4 semanas (P-20). \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

## 9.- NIVELES DE NITRITOS EN ORINA

Para obtener las muestras de orina, los animales se alojaron de forma individual durante 3 días en jaulas metabólicas, que por su diseño permiten recolectar la orina de forma independiente de las heces. Las muestras se recogen sobre glicerina para evitar la pérdida por evaporación y azida sódica ( $10^{-4}$  M) para evitar el crecimiento bacteriano. El NO tiene una vida media muy corta transformándose en sus metabolitos estables: nitritos y nitratos. Una forma indirecta de medir la producción de NO es mediante la cuantificación de estos metabolitos. Nosotros hemos utilizado el método de Griess para cuantificar los nitritos en orina recogida durante 24 horas. El reactivo de Griess está compuesto por dos soluciones:

**A-** Hidrocloruro de n-(1-naftil) etilen-diamina

**B-** Sulfanilamida y  $H_3PO_4$  al 5%.

Estas soluciones se mezclan a partes iguales, antes de iniciar la determinación y 100  $\mu$ L se mezclan con 100  $\mu$ L de muestra. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 540 nm. La concentración de nitritos se determina a partir de una curva patrón de nitrito sódico.

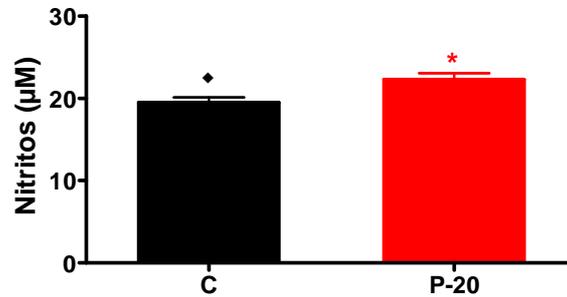
### Expresión y análisis de los resultados

Todos los resultados se expresan en  $\mu$ M como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 5 determinaciones. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó la prueba “t” de Student para datos no pareados o el ANOVA de un vía seguido de Bonferroni, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

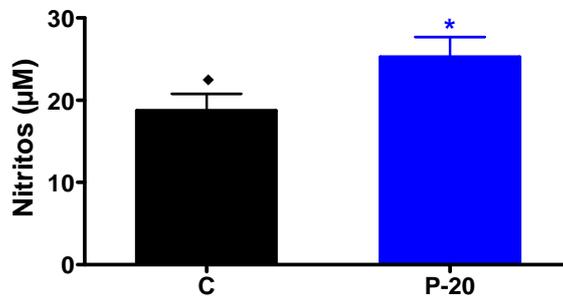
### Resultados

Comparando los grupos controles entre ratas SHR de 24 y 12 semanas frente al grupo WKY control, se observa que el nivel de nitritos era más alto en las últimas. El tratamiento con pravastatina aumentó los niveles de nitritos tanto en ratas SHR de 24 semanas como en ratas SHR de 12 semanas. En las ratas WKY las diferencias no llegaron a ser significativa (Figura 47).

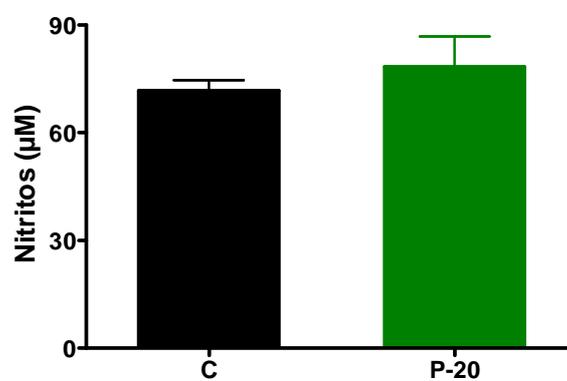
SHR 24 semanas **a**



SHR 12 semanas **b**



WKY 16 semanas **c**



**Figura 47.-** Niveles de nitritos en orina de ratas genéticamente hipertensas (SHR) de 24 semanas **(a)**, 12 semanas **(b)** y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas **(c)**, control (C) y tratadas con 20 mg/Kg/día de pravastatina (P-20) durante 4 semanas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control,  $\blacklozenge p < 0,05$  frente al grupo control WKY.



## VALORACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PRAVASTATINA

Teniendo en cuenta diversos indicios acerca de la capacidad antioxidante de las estatinas descritos en la bibliografía y los resultados obtenidos en este trabajo después del tratamiento crónico con pravastatina, decidimos evaluar esta capacidad antioxidante realizando una serie de ensayos *in vitro* con anillos de aorta.

Hemos utilizado ratas SHR, que presentan una respuesta relajante vascular a ACh reducida debido al daño o disfunción endotelial inducido por el estado hipertensivo. También hemos llevado a cabo ensayos con ratas Wistar, en este caso podemos provocar, de manera experimental, una alteración en los niveles de  $O_2^-$  que modifique la respuesta vascular y estudiar así la capacidad y el mecanismo de acción de pravastatina para neutralizar ese efecto.

### 1.- EFECTO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR

#### 1.1.- Estudios en ratas SHR

Se utilizan anillos de aorta de ratas SHR (400-500 g). La preparación y el montaje en baño de órganos se realizan según el protocolo explicado en el apartado 4.1. Los anillos se incuban con pravastatina ( $10^{-5}$  M, **P-5** o  $10^{-4}$  M, **P-4**) durante 2 horas sin tensión, cambiando la solución Krebs cada 30 minutos, pasado este tiempo los anillos se someten a una tensión de 2 g y se dejan estabilizar 60 minutos más reajustando la tensión si fuera necesario. A continuación se hacen curvas concentración respuesta a ACh ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos precontraídos con FE ( $10^{-6}$  M). En otros anillos la pravastatina se retira del medio 30 minutos antes de realizar la curva. Los experimentos con la dosis más alta de pravastatina se repiten en presencia del ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M, **P-4+Mev**). Se realizan experimentos adicionales incubando con pravastatina durante un tiempo corto de 10 minutos, justo antes de hacer la curva.

## 1.2.- Estudios en ratas Wistar

Según describen Tarpey y col. (Tarpey et al., 1999), concentraciones elevadas de lucigenina pueden dar lugar a procesos de oxidorreducción que favorecen la formación de  $O_2^-$  y provocan una pérdida de la relajación dependiente de endotelio en anillos de aorta *in vitro*. Se utilizan aortas de ratas Wistar (350-400 g) para evaluar si pravastatina es capaz de mejorar el daño provocado por la incubación con lucigenina. Como compuesto de referencia se utiliza SOD. La preparación y el montaje de los anillos de aorta se realizan según el protocolo explicado en el apartado 4.1. Tras el montaje y el periodo de estabilización la funcionalidad del tejido se comprueba añadiendo al baño FE ( $10^{-6}$  M), una vez alcanzada una meseta de contracción se añade ACh ( $10^{-6}$  M), cuya respuesta relajante nos indica el estado funcional del endotelio. Los anillos que muestran una relajación menor del 60% se descartan. A continuación se lavan repetidamente los anillos y se dejan estabilizar durante 1 hora. Posteriormente, se añade al baño de órganos lucigenina (250  $\mu$ M), se incuban los anillos durante 1 hora y se hacen curvas de relajación a ACh ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) o NTP ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) en anillos previamente contraídos con FE ( $10^{-6}$  M). Durante el tiempo de incubación con lucigenina, en algunos baños se añade simultáneamente pravastatina ( $10^{-4}$  M, **P-4**) y en otros SOD (200 U/mL). Los experimentos con la dosis más alta de pravastatina se repiten en presencia del ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M, **P-4+Mev**).

Para estudiar si pravastatina sólo posee algún efecto sobre la respuesta relajante de ACh o NTP, algunos anillos se incuban durante 1 hora con pravastatina ( $10^{-4}$  M) en ausencia de lucigenina. Las curvas de ACh también se realizan después de incubar con SOD en ausencia de lucigenina.

## 2.- EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

La producción de  $O_2^-$  se determina en aorta de ratas Wistar mediante quimioluminiscencia, utilizando lucigenina. El método utilizado presenta ligeras modificaciones respecto al descrito en el apartado 7.

En una primera serie de experimentos se mide la producción basal de  $O_2^-$  después de un periodo de incubación con dosis altas de lucigenina. Los anillos control se mantienen en Krebs-HEPES a 37 °C durante 30 minutos y el resto de los anillos se incuban con lucigenina (250  $\mu$ M). A continuación los anillos se transfieren a un tubo especial para luminómetro que contiene tampón HEPES con lucigenina (5  $\mu$ M) y se mide la señal luminiscente como se describe en el apartado 7.

Durante este periodo de incubación además de lucigenina, en anillos diferentes, también están presentes pravastatina ( $10^{-4}$  M) o pravastatina más ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M). Como en los estudios de reactividad vascular, utilizamos como referencia anillos incubados con SOD (200 U/mL) en presencia de lucigenina.

La presencia de NADPH ( $10^{-4}$  M) nos permite valorar, en anillos control, la producción de  $O_2^-$  después de la estimulación de la NADPH-oxidasa y la incubación previa con diferentes dosis de pravastatina ( $10^{-5}$  M o  $10^{-4}$  M) el efecto de ésta sobre dicha producción estimulada.

### **Expresión y análisis estadístico de los resultados**

El efecto provocado por ACh y NTP se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE. Los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 6 experimentos. Para comparar las curvas se utiliza la prueba *F* de Snedecor, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ . Para la comparación entre grupos se usa el ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni, cuando fue necesario, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Los resultados que se muestran en la tabla 11 nos indican que la respuesta máxima a ACh en anillos control de ratas SHR no alcanzó en ningún caso el 40% de relajación, lo que nos indica una pérdida importante de la relajación dependiente de endotelio. La incubación con pravastatina durante 3 horas mejoró de forma dosis

dependiente la respuesta a ACh (Figura 48a). Resultados similares, pero más discretos, se obtuvieron cuando la incubación se llevó a cabo también durante 3 horas pero los últimos 30 minutos la pravastatina se retiró del medio (Figura 48c).

Las curvas dosis respuesta a ACh se repitieron en presencia del ácido mevalónico usando la concentración más alta de pravastatina. Mientras la respuesta a ACh se revirtió alrededor del 50% cuando la pravastatina estaba presente en el medio (Figura 48b) esta reversión fue casi total cuando la pravastatina se retiró 30 minutos antes de realizar la curva (Figura 48d). Además, observamos que la presencia de pravastatina en el baño durante un periodo corto (10 minutos) también mejoraba ligeramente la respuesta a ACh (Figura 49). En la tabla 11 se recogen las variaciones en la respuesta máxima después de los diferentes tratamientos.

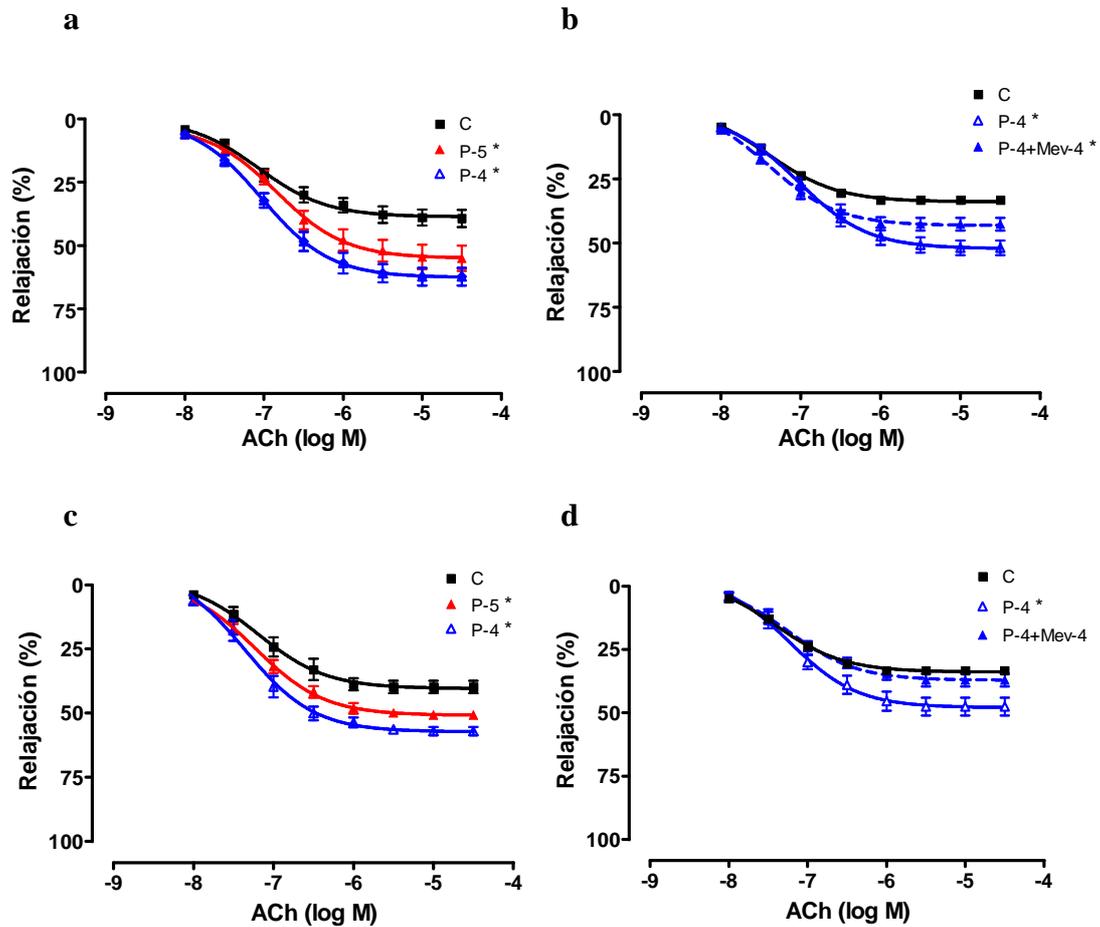
En los experimentos llevados a cabo en anillos de aorta de ratas Wistar se observó que después de la incubación con una dosis alta de lucigenina (250  $\mu$ M), se produjo una importante pérdida de la respuesta relajante a ACh ( $84,3 \pm 2,3\%$  frente a  $21,7 \pm 2,8\%$ ,  $p < 0,05$ ). Como cabía esperar, la incubación simultánea con SOD evitó de manera significativa la pérdida de la relajación (Figura 50), un efecto muy similar se observó tras la incubación con pravastatina (Figura 51). Cuando los anillos se incubaron sólo con SOD o sólo con pravastatina no se alteró la respuesta a ACh respecto al grupo control (Figura 50 y Figura 51). Como muestra la figura 52 la incubación con ácido mevalónico fue incapaz de revertir el efecto de la pravastatina.

En los anillos incubados con lucigenina, las curvas a NTP, se desplazaron a la derecha. Este efecto de lucigenina se eliminó después de la incubación con pravastatina y, como el caso de las curvas a ACh, la incubación con ácido mevalónico no pudo revertir el efecto de la pravastatina. Tampoco la presencia de pravastatina sola modificó la respuesta a NTP respecto a los controles (Figura 53).

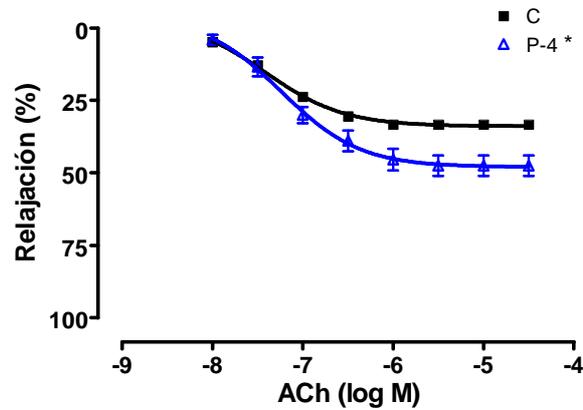
En los ensayos de quimioluminiscencia observamos que la señal basal aumentó considerablemente después de la incubación con altas dosis de lucigenina ( $79 \pm 8$  RLU/min/mg frente a  $1337 \pm 259$  RLU/min/mg,  $p < 0,05$  en anillos control o incubados con lucigenina 250  $\mu$ M respectivamente). La presencia en el medio de incubación junto a la lucigenina, de un captador de radicales  $O_2^{\cdot -}$  como SOD impidió este aumento de la señal, algo similar ocurrió cuando el compuesto presente en el medio,

era pravastatina. El ácido mevalónico no fue capaz de revertir este efecto observado con pravastatina (Figura 54).

Cuando la producción de radicales  $O_2^-$  se estimuló con NADPH, la presencia de pravastatina determinó una disminución dosis dependiente de la señal luminiscente. El efecto de pravastatina no se revertió por la presencia de diferentes dosis de ácido mevalónico (Figura 55).



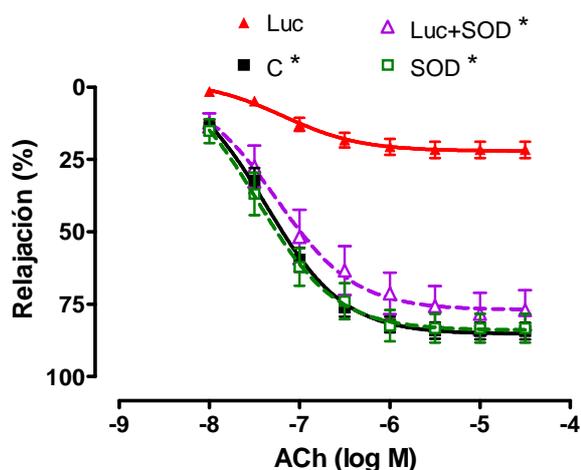
**Figura 48.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria aorta precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas genéticamente hipertensas. Control (C), incubados con pravastatina ( $10^{-5}$  M, P-5,  $10^{-4}$  M, P-4) o pravastatina  $10^{-4}$  M más ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M) (P-4+Mev-4). Los anillos se incubaron durante tres horas en presencia de pravastatina (a, b) o ausencia del medio 30 minutos antes de realizar la curva (c, d). \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.



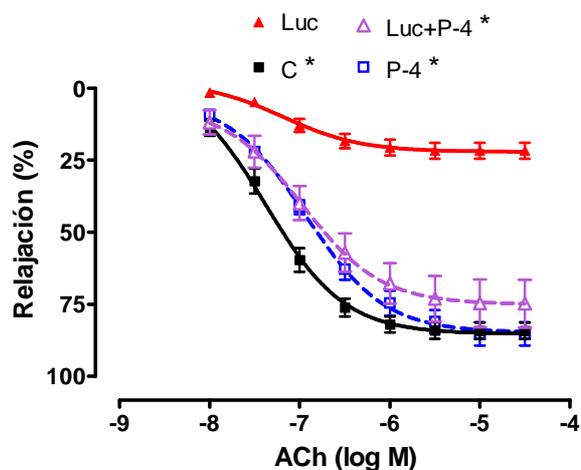
**Figura 49.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria aorta precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$ M) de ratas genéticamente hipertensas. Control (C) o incubados con pravastatina ( $10^{-4}$  M, **P-4**) durante 10 minutos. \* $p < 0,05$  frente al grupo control.

	ACh ( $E_{max}$ %)		
	C	P-5	P-4
<b>3 h</b>	39,2±3,4	55,1±5,0*	62,3±3,4*
<b>2h y 30 min</b>	39,8±2,4	50,8±1,2*	57,1±1,6*
<b>10 min</b>	33,3±0,6	-	47,5±3,5*

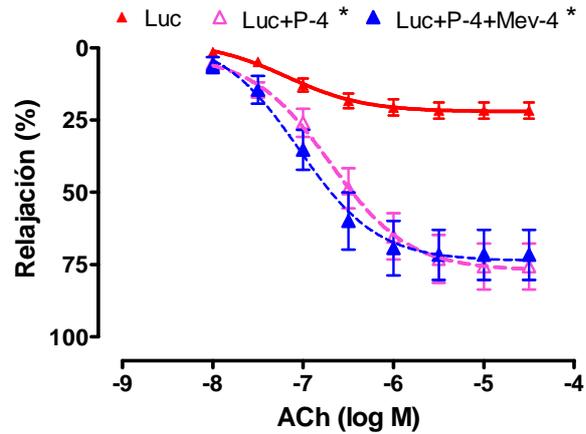
**Tabla 11.-** Valores de relajación máxima ( $E_{max}$ ) de las curvas concentración respuesta a acetilcolina en arteria aorta de ratas genéticamente hipertensas. Control (C), incubados con pravastatina ( $10^{-5}$  M, **P-5**,  $10^{-4}$  M, **P-4**). Los anillos se incubaron con pravastatina durante (**3 h**, **2h y 30 min**, o **10 min**) antes de realizar la curva. \* $p < 0,05$  frente al grupo control.



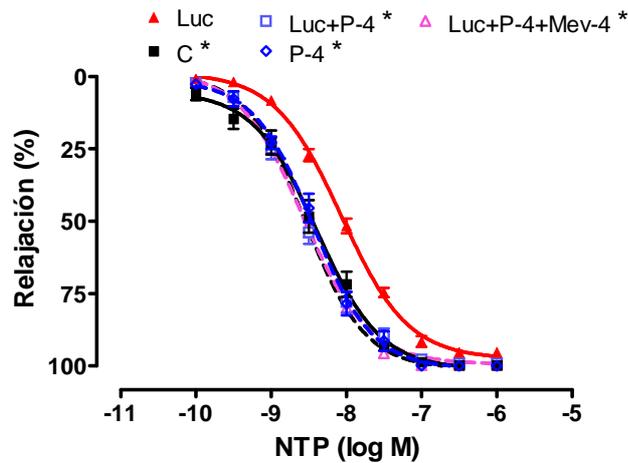
**Figura 50.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria aorta precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas Wistar. Control (C), incubados con lucigenina (250  $\mu$ M, **Luc**), SOD (200 U/mL, **SOD**), o lucigenina y SOD (**Luc+SOD**). \*  $p < 0,05$  frente al grupo incubado sólo con lucigenina.



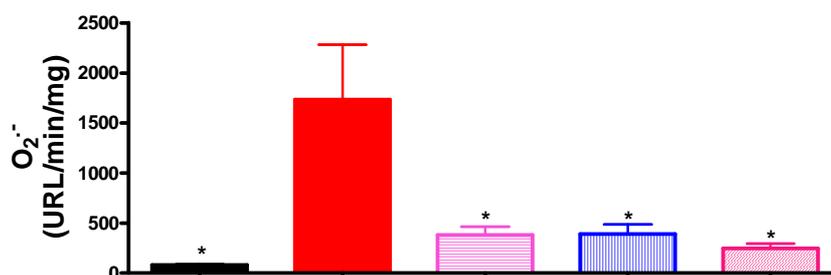
**Figura 51.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria aorta precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas Wistar. Control (C), incubados con lucigenina (250  $\mu$ M, **Luc**), pravastatina ( $10^{-4}$  M, **P-4**), o lucigenina y pravastatina (**Luc+P-4**). \*  $p < 0,05$  frente al grupo incubado sólo con lucigenina.



**Figura 52.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria aorta precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas Wistar. Incubados con lucigenina (250  $\mu$ M, **Luc**), lucigenina y pravastatina ( $10^{-4}$  M, **Luc + P-4**) o lucigenina, pravastatina y ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M) (**Luc+P-4+Mev-4**). \* $p < 0,05$  frente al grupo incubado sólo con lucigenina.

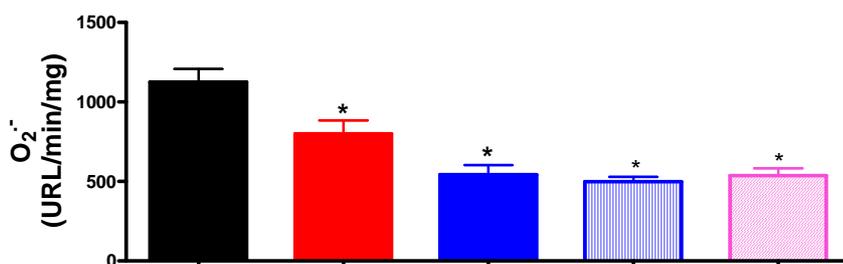


**Figura 53.-** Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) en anillos de arteria aorta precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M) de ratas Wistar. Control (C), incubados con lucigenina (250  $\mu$ M, **Luc**), pravastatina ( $10^{-4}$  M, **P-4**), lucigenina y pravastatina (**Luc+P-4**) o lucigenina, pravastatina y ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M) (**Luc+P-4+Mev-4**). \* $p < 0,05$  frente al grupo incubado sólo con lucigenina.



<b>Lucigenina (250 <math>\mu</math>M)</b>	-	+	+	+	+
<b>SOD (200 U/mL)</b>	-	-	+	-	-
<b>Pravastatina (<math>10^{-4}</math> M)</b>	-	-	-	+	+
<b>Ácido mevalónico (<math>10^{-4}</math> M)</b>	-	-	-	-	+

**Figura 54.-** Incremento en los niveles de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) provocado por incubación con lucigenina (250  $\mu$ M) en anillos de arteria aorta de ratas Wistar. Efecto de pravastatina, SOD y ácido mevalónico sobre dicho incremento. \*  $p < 0,05$  frente al grupo incubado sólo con lucigenina.



<b>NADPH (100 <math>\mu</math>M)</b>	+	+	+	+	+
<b>Pravastatina (10<sup>-5</sup> M)</b>	-	+	-	-	-
<b>Pravastatina (10<sup>-4</sup> M)</b>	-	-	+	+	+
<b>Ácido mevalónico (10<sup>-4</sup> M)</b>	-	-	-	+	-
<b>Ácido mevalónico (10<sup>-2</sup> M)</b>	-	-	-	-	+

**Figura 55.-** Niveles de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) medidos en anillos de arteria aorta de ratas Wistar después de la estimulación con NADPH ( $10^{-4}$  M) en ausencia o en presencia de pravastatina y ácido mevalónico. \*  $p < 0,05$  frente al grupo incubado solo con NADPH.



## ENSAYOS EN ARTERIAS HUMANAS

En el estudio se han utilizados arterias radiales y mamarias procedentes de pacientes sometidos a cirugía de *bypass* entre los años 2007-2009. Las muestras fueron suministradas por el Servicio de Cirugía Cardíaca del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. Los estudios se han llevado a cabo de acuerdo con la declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 1964, enmendada en octubre de 2008).

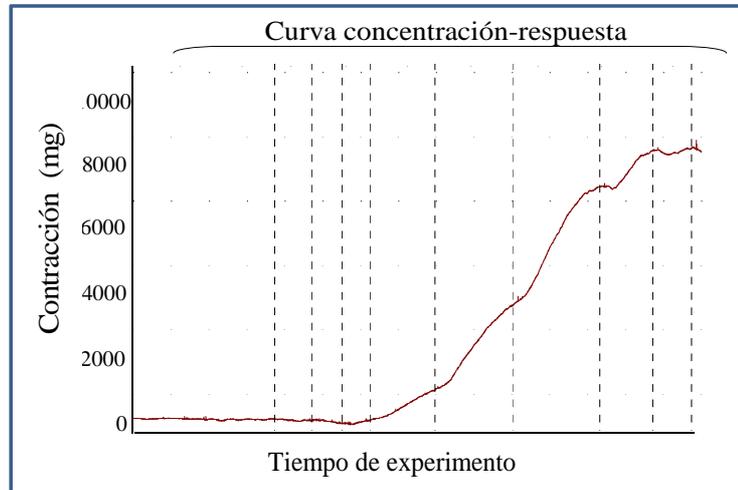
### 1.- EFECTO SOBRE LA REACTIVIDAD VASCULAR

En un trabajo previo se pusieron a punto las condiciones experimentales para la realización curvas dosis-respuesta en anillos de arterias humanas. Se valoró la capacidad de respuesta tanto de agentes contracturantes como relajantes en arterias radiales y mamarias (Kassan, 2007).

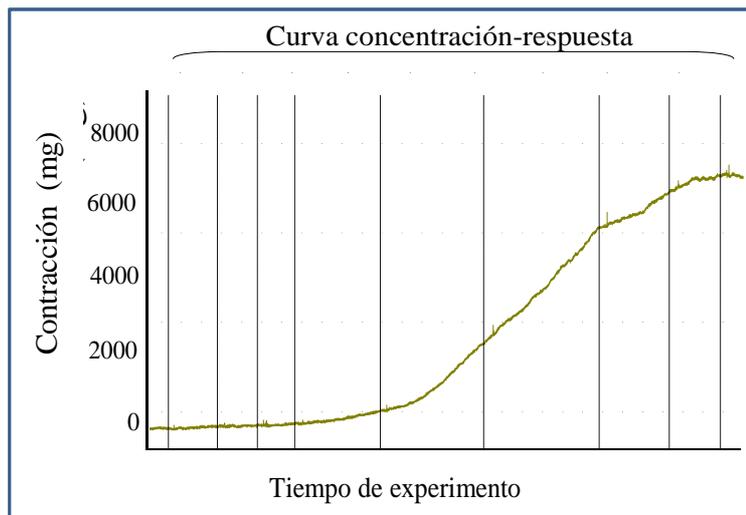
Los segmentos de arterias sobrantes de la intervención quirúrgica se recogen en solución Krebs mantenida a 4 °C y se trasladan inmediatamente al laboratorio. Allí se limpian, eliminando el tejido graso y conectivo que las rodean y se cortan en segmentos de 3-4 mm. Los anillos se montan de forma similar a la descrita en el apartado 4.1 y se evalúa el efecto que provoca la incubación con pravastatina sobre la reactividad vascular. Los anillos se incuban en ausencia (C) o en presencia de pravastatina ( $10^{-5}$  M, **P-5**) durante 2 horas en baños para órgano aislado. En este momento se aplica a todos los anillos una tensión de 2 g y se espera una hora más reajustando la tensión si fuera necesario. A continuación se construyen curvas dosis respuesta a agente contracturantes y relajantes (Figura 56 y 57).

Se añade al baño de forma acumulativa, concentraciones crecientes de los siguientes agentes: FE ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-4}$  M) y un análogo de tromboxano (U46619,  $10^{-12}$ - $3 \times 10^{-8}$ ). En el caso de U46619, las curvas se repitieron en presencia del ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M). Previa contracción de los anillos con FE  $10^{-6}$  M, y una vez alcanzada una meseta estable, se realizan curvas acumulativas concentración-respuesta a ACh ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) y NTP ( $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M). Las curvas a ACh se repitieron en presencia del ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M).

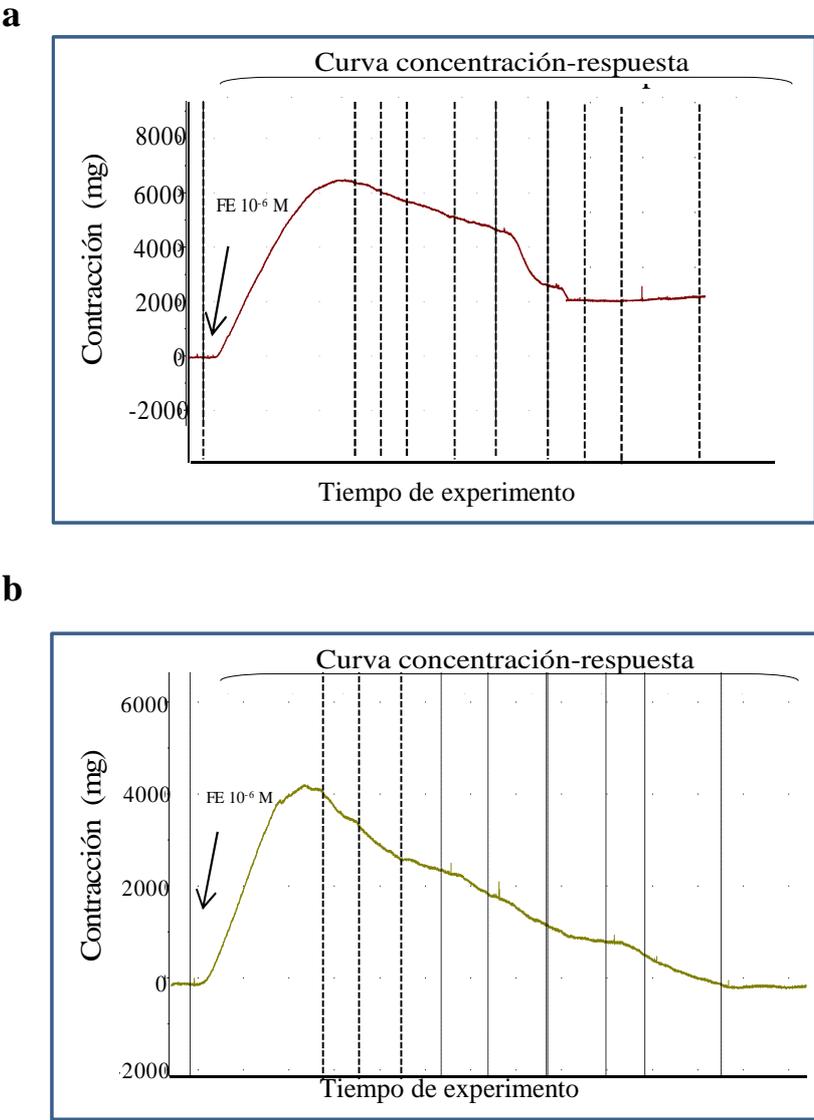
**a**



**b**



**Figura 56.-** Registro original de una curva de contracción a U46619 en arteria radial humana en ausencia **(a)** y en presencia **(b)** de pravastatina.



**Figura 57.-** Registro original de una curva de relajación a acetilcolina en arteria radial humana en ausencia **(a)** y en presencia **(b)** de pravastatina.

### **Expresión y análisis de los resultados**

Las respuestas a los agentes contracturantes se expresan en mg de contracción y a los agentes relajantes se expresan como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE.

En cada serie de experimentos, los resultados se expresan como la media aritmética  $\pm$  EEM. Para comparar las curvas se utiliza la prueba *F* de Snedecor considerando diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

Las muestras se obtuvieron de 70 pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica. La mayoría de las muestras resultaron viables (62 pacientes) y, de éstas un 67% correspondieron a anillos de arterias mamarias y un 33% a anillos de arterias radiales.

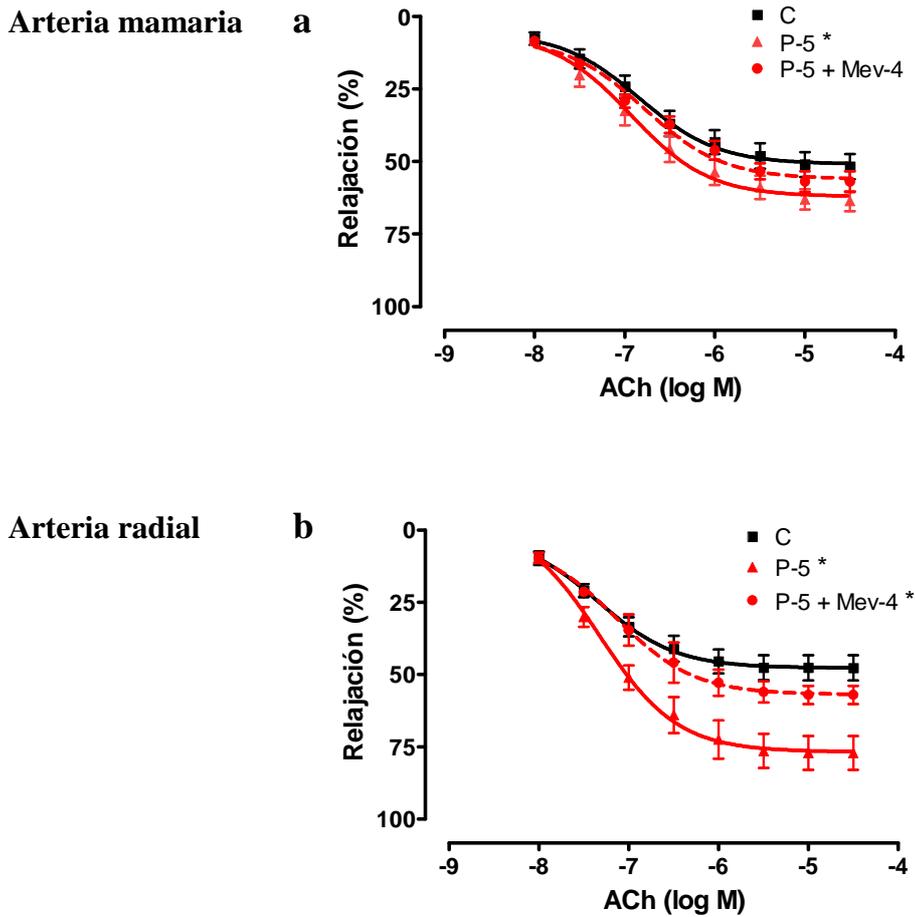
En los anillos de arteria mamaria se han ensayado U46619, FE, ACh y NTP. En los anillos de arterias radiales, debido al menor número de muestras disponibles, solo pudimos realizar curvas dosis-respuestas a ACh y U46699.

Independientemente del tipo de arteria, la incubación con pravastatina incrementó la respuesta a ACh. Como se puede observar en la figura 58, el efecto beneficioso de pravastatina fue mayor en arterias radiales que en mamarias y se revirtió sólo parcialmente en presencia del ácido mevalónico (Tabla 12A).

La relajación a NTP en arterias mamarias fue similar en ausencia o en presencia de pravastatina alcanzándose una respuesta próxima al 100%. La incubación no modificó ni la sensibilidad ni la respuesta máxima (Figura 59).

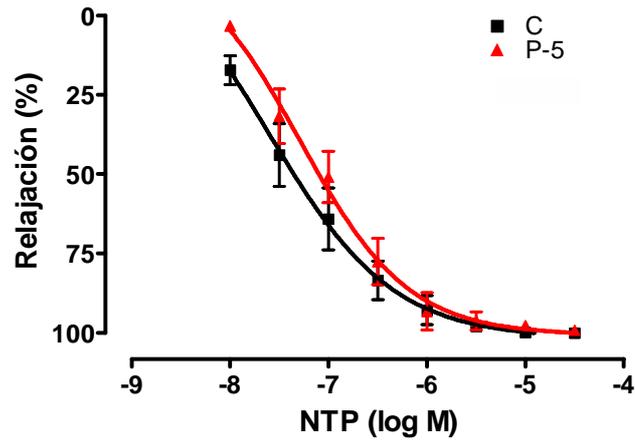
La respuesta contracturante a U46619 fue mayor en arterias radiales que en mamarias, y como se puede observar en la figura 60 la incubación con pravastatina fue capaz de reducir la respuesta contracturante en los dos tipos de arterias. La incubación con ácido mevalónico revirtió completamente el efecto de pravastatina (Tabla 12B).

La acción contracturante de FE en arterias mamarias no se modificó después de incubarse con pravastatina (Figura 61).



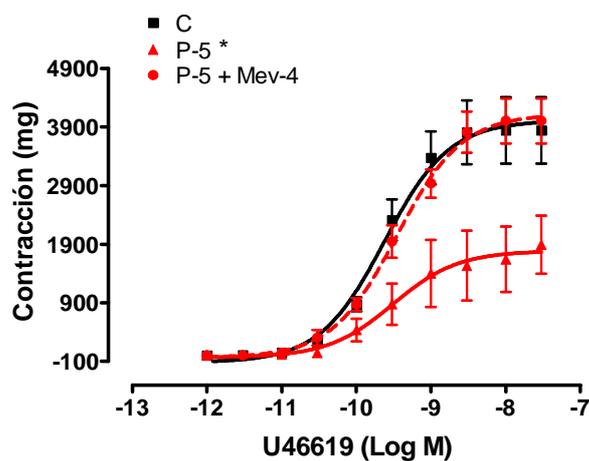
**Figura 58.-** Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria mamaria (a) y radial (b) precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M), en ausencia (C), o en presencia de pravastatina ( $10^{-5}$  M, P-5) o pravastatina y ácido mevalónico ( $10^{-4}$  M) (P-5+Mev-4) durante tres horas. \* $p < 0,05$  frente al grupo control.

**Arteria mamaria**

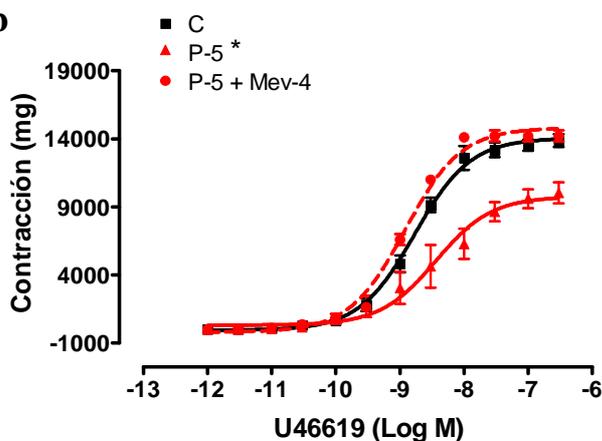


**Figura 59.-** Curvas concentración-respuesta a nitroprusiato sódico (NTP,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en anillos de arteria mamaria precontraídos con fenilefrina (FE,  $10^{-6}$  M), en ausencia (C) o en presencia de pravastatina ( $10^{-5}$  M; P-5) durante tres horas.

Arteria mamaria **a**

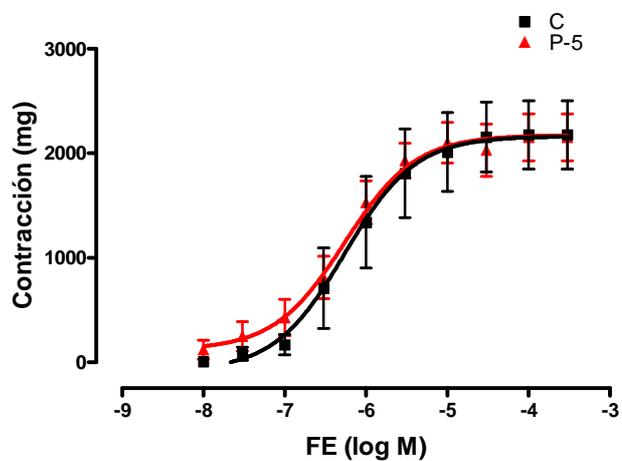


Arteria radial **b**



**Figura 60.-** Curvas concentración-respuesta a U46619 ( $10^{-12}$ - $3 \times 10^{-8}$  M) en anillos de arteria mamaria **(a)** y a U46619 ( $10^{-12}$ - $3 \times 10^{-7}$  M) en anillos de arteria radial **(b)**, en ausencia **(C)**, o presencia de pravastatina ( $10^{-5}$  M; **P-5**) o pravastatina y ácido mevalónico  $10^{-4}$  M (**P-5+Mev-4**) durante tres horas. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

### Arteria mamaria



**Figura.61.-** Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE,  $10^{-8}$ - $3 \times 10^{-4}$  M) en anillos de arteria mamaria, en ausencia (C) o en presencia de pravastatina ( $10^{-5}$  M; P-5) durante tres horas.

<b>Acetilcolina A</b>	<b>Arteria mamaria E<sub>max</sub> (%)</b>	<b>Arteria radial E<sub>max</sub> (%)</b>
<b>C</b>	51,8±4,3	47,7±4,4
<b>C+P-5</b>	63,7±3,5*	77,1±5,8*
<b>C+P-5+Mev-4</b>	56,9±3,6	57,1±3,2*

<b>U46619 B</b>	<b>Arteria mamaria E<sub>max</sub> (mg)</b>	<b>Arteria radial E<sub>max</sub> (mg)</b>
<b>C</b>	3844±567	13873±473
<b>C+P-5</b>	1892±496*	10032±772*
<b>C+P-5+Mev-4</b>	4004±385	14201±408

**Tabla 12.-** Valores máximos (E<sub>max</sub>) de relajación a acetilcolina (A) y de contracción a U46619 (B) en anillos de arteria mamaria y radial, en ausencia (C) o en presencia de pravastatina (10<sup>-5</sup> M; P-5) o pravastatina y ácido mevalónico (10<sup>-4</sup> M) (P-5+Mev-4). \* p<0,05 frente al grupo control.

## 2.- PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

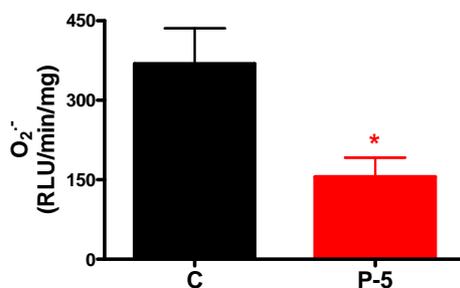
Se determinó la producción basal de  $O_2^{\cdot-}$  mediante quimioluminiscencia en anillos de arteria mamaria como describimos previamente en el apartado 7. Los anillos se incuban en Krebs-HEPES durante 30 minutos a 37° C en ausencia (C) o en presencia de pravastatina ( $10^{-5}$  M; **P-5**). A continuación los anillos se trasladan a un tubo especial para luminómetro que contiene tampón HEPES con lucigenina (5  $\mu$ M) y se lee la luminiscencia en presencia o ausencia de pravastatina.

### Expresión y análisis de los datos

La producción de  $O_2^{\cdot-}$  se expresa como URL/min/mg de tejido. Los resultados se expresan como media aritmética  $\pm$  EEM de un mínimo de 7 experimentos. Para comparar las diferencias entre grupos se utilizó el test de “*t*” de Student, considerándose diferencias significativas cuando  $p < 0,05$ .

### Resultados

Como se puede observar en la figura 62, la incubación con pravastatina redujo la intensidad de la señal en un 60% frente al grupo control.



**Figura 62.-** Efecto de pravastatina sobre la producción basal de aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en arteria mamaria. \*  $p < 0,05$  frente al grupo control.

*DISCUSIÓN*



Las enfermedades cardiovasculares constituyen la primera causa de morbilidad y mortalidad del mundo desarrollado, con la isquemia cardiaca como responsable de la mayoría de las muertes. Según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística referentes a 2007, la población española también se ajusta a este patrón (I.N.E. 2009).

Varios ensayos clínicos a gran escala como CARE, WOSCOPS, LIPID, ASCOT-LLA, entre otros, han demostrado los efectos beneficiosos de las estatinas en la prevención de la enfermedad cardiovascular. El FRAMINGHAM HEART STUDY ([www.framinghamheartstudy.org](http://www.framinghamheartstudy.org)) demostró que los niveles elevados de colesterol es un importante factor de riesgo para estas enfermedades y que la reducción del colesterol y, más concretamente, la reducción de LDL-colesterol se asocia con un beneficio clínico mayor (Cannon et al. 2004). Las estatinas se han convertido en uno de los grupos de fármacos más prescritos en el mundo en el tratamiento de las dislipidemia y para prevenir las complicaciones derivadas del proceso aterosclerótico. Al inhibir la enzima HMG-CoA reductasa, que cataliza la síntesis hepática del colesterol, da lugar a una reducción en la síntesis y secreción de lipoproteínas por el hígado y a un incremento en los receptores de LDL en los hepatocitos, que determina un incremento en la recaptación de LDL con la consiguiente reducción en plasma tanto de esta lipoproteína como de colesterol. El potente efecto de las estatinas en el metabolismo del colesterol y la bien conocida relación entre colesterol y aterosclerosis coronaria, sugiere que la reducción de la mortalidad por estos fármacos podría explicarse por la reducción de lípidos, sin embargo, cada vez son más las evidencias que apuntan a que otros efectos de las estatinas (efectos pleiotrópicos) pueden contribuir a sus efectos beneficiosos a nivel cardiovascular (Halcox y Deanfield, 2004; Wang et al., 2008). Al inhibir la HMG-CoA reductasa las estatinas también interfieren en la síntesis de isoprenoides intermediarios, como el farnesil y geranyl-pirofosfato, que intervienen la translocación de una variedad de proteínas, incluyendo las GTPasas pequeñas como Rho, Rac y Ras, que tienen un papel importante en los procesos de señalización celular. Por tanto, las estatinas reducen los eventos cardiovasculares no solamente en pacientes hipercolesterolémicos, sino también en pacientes normocolesterolémicos

con enfermedad coronaria o con otros factores de riesgo cardiovascular. Entre estos factores de riesgo tiene especial relevancia la HTA, un estado patológico caracterizado por un aumento crónico de la presión arterial por encima de los considerados “valores normales” (< 90/140 mmHg de presión diastólica y sistólica respectivamente). También es conocida como la “sutil asesina” o la “asesina silenciosa”, ya que durante la mayor parte de su evolución no presenta síntomas, pero si no se trata puede originar graves complicaciones cardiovasculares, como son el infarto del miocardio y la enfermedad cerebrovascular. En España, según datos de la Sociedad Española de Hipertensión Arterial, aproximadamente un 35% de la población adulta (>18 años) padece hipertensión, pudiendo llegar al 68% en los mayores de 60 años, afectando a unos 10 millones de sujetos adultos (Banegas et al., 2009).

Con estos antecedentes nos planteamos este estudio con pravastatina con el objetivo de investigar sus efectos, independientes de la reducción del colesterol, sobre las alteraciones estructurales y funcionales resultantes del proceso hipertensivo. Para ello utilizamos un modelo de hipertensión genética, las ratas SHR que tratamos de forma crónica con pravastatina.

Las SHR son un modelo de hipertensión desarrollado por Okamoto y Oaki (Okamoto y Aoki 1963) mediante meticulosos cruces que dieron lugar a que un 100% de la progenie desarrollase hipertensión. Las ratas SHR se utilizan ampliamente en investigación porque presentan muchas similitudes con la HTA en humanos y porque es un buen modelo para estudiar las complicaciones de la hipertensión (Lerman et al., 2005). En estos animales la hipertensión se desarrolla gradualmente hasta alcanzar unos niveles elevados a partir de las 12 semanas de edad (Badyal et al., 2003).

En este estudio pudimos comprobar ese desarrollo gradual, donde los valores de PAS se incrementaron desde los  $158 \pm 1$  mmHg en las ratas de 8 semanas a los  $211 \pm 2$  mmHg en las ratas de 24 semanas. Por el contrario, los niveles de PAS en sus congéneres normotensas (ratas WKY) se mantuvieron constantes en valores próximos a 140 mmHg.

Para el estudio se utilizaron ratas SHR de 20 semanas, las cuales presentan una hipertensión bien establecida, de 8 semanas, con una hipertensión incipiente y ratas WKY. El tratamiento se llevo a cabo durante 4 semanas con una dosis de 20 mg/Kg/día de pravastatina y los resultados del tratamiento se compararon con los obtenidos en animales de la misma cepa y edad no tratados (control). Además, las ratas SHR se compararon con ratas WKY, lo que nos sirve para evaluar el papel que juega la HTA en el desarrollo de lesiones cardiovasculares.

Con la dosis de pravastatina ensayada los niveles plasmáticos de colesterol no se modificaron. Este resultado y el hecho que las ratas no son un buen modelo para el desarrollo de placas de ateroma hacen que estos animales sean adecuados para estudiar posibles efectos pleiotrópicos de pravastatina.

En las ratas WKY, que mantuvieron una presión estable durante el estudio, el tratamiento con pravastatina no ejerció ningún efecto apreciable sobre este parámetro. Por el contrario, la administración de pravastatina en las ratas SHR impidió la subida de la PAS que observamos en ambos grupos de edad durante las 4 semanas del estudio. Podemos considerar por lo tanto que pravastatina no tiene un efecto antihipertensivo propiamente dicho.

Uno de los objetivos principales de nuestro estudio era determinar si el tratamiento con pravastatina podría mejorar las alteraciones en la funcionalidad vascular, ya que estas alteraciones son fundamentales en el desarrollo y el mantenimiento de las enfermedades cardiovasculares y su regresión es hoy en día uno de los objetivos de la terapéutica.

Se sabe que el NO juega un papel importante en el mantenimiento de la presión arterial, pues el tratamiento con L-NAME, un inhibidor de la NOS, produce hipertensión (Rees et al., 1989a). En estados de hipertensión establecida, tanto en humanos como en distintos modelos de hipertensión animal (genético y experimental), las relajaciones endotelio dependientes se encuentran disminuidas con respecto a sus controles normotensos (Nava y Luscher, 1995; Takase et al., 1996).

En los estudios llevados a cabo en arteria aorta observamos diferencias apreciables en la respuesta máxima a ACh entre los grupos controles hipertenso y

normotenso, diferencias que se agudizaron con la edad ( $70,7 \pm 1,2\%$  en las ratas WKY,  $45,5 \pm 2,6\%$  en las ratas SHR de 12 semanas y  $37,4 \pm 2,6\%$  en las ratas SHR de 24 semanas). Estos resultados nos confirman una pérdida de función endotelial por una elevación sostenida de la presión arterial.

Cuando analizamos la respuesta a ACh en aortas procedentes de animales tratados observamos que solo se mejoró la relajación en las SHR de 12 semanas. Como hemos indicado anteriormente, la arteria aorta de las ratas WKY control conserva intacta su capacidad relajante en respuesta a ACh por lo que no nos sorprendió que las ratas tratadas no mostraran diferencias en esta respuesta respecto a sus controles. Sí resultó más extraño observar la falta de efecto en las ratas de más edad, en las que incluso pudimos observar un ligero efecto hipotensor al medir la PAS. Nuestra experiencia en este tipo de tratamientos que apenas modifican los valores de PAS (Gómez-Roso, 2008; Ardanaz-Martínez, 2003), nos hace pensar que quizás con un periodo de tratamiento mas largo podríamos haber observado efectos a este nivel.

Varios estudios se han centrado en investigar la capacidad del endotelio para generar NO en este modelo de hipertensión arterial. A este respecto, se ha demostrado la existencia de una alteración en la síntesis de NO, probablemente secundaria a una disminución de la actividad de la eNOS o a un aumento del catabolismo del NO inducido por radicales libres de oxígeno. En este grupo de animales la mejoría en la relajación endotelio dependiente se acompañó de un incremento en la expresión de eNOS en aorta y un aumento de los niveles de nitritos en orina. Estos datos están en concordancia con el trabajo del grupo de Wassmann que demostró que 4 semanas de tratamiento con atorvastatina mejora la relajación endotelio dependiente y aumenta la expresión de eNOS en aortas de ratas SHR (Wassmann et al., 2001). La capacidad de las estatinas para estabilizar el ARNm de la eNOS podría explicar este efecto.

No podemos descartar un efecto directo de pravastatina sobre las caveolinas, pues otro estudio muestra la capacidad de las estatinas para reducir la expresión de la caveolina-1 (Brouet et al., 2001). Cuando la eNOS está asociada a las caveolinas, proteínas estructurales de las caveolas, es inactiva, la movilización de  $Ca^{2+}$  promueve

que la calmodulina se una a la eNOS y se disocie de la caveolina produciendo la activación de la enzima, por tanto, la caveolina así como la calmodulina modulan la actividad catalítica de eNOS regulando la producción de NO. Todos estos resultados apuntan a un efecto beneficioso de pravastatina sobre la producción de NO.

Las prostaglandinas son mediadores importantes en la regulación de las funciones cardiovasculares. En vasos sanguíneos sanos, la mayoría de los prostanoïdes se sintetizan por la isoforma constitutiva de la ciclooxigenasa (COX-1). No obstante, estos mediadores también pueden sintetizarse por la isoforma inducible de la enzima (COX-2), que puede inducirse por diversos agentes como lipopolisacáridos o citocinas (Vagnoni et al, 1999; Hernanz et al, 2003). En los últimos años, se ha hecho evidente que la producción de prostanoïdes por parte de la COX-2 está relacionada con la modulación de las respuestas vasculares (Henrion et al., 1997; García-Cohen et al., 2000; Adeagbo et al., 2005).

La hipertensión, considerada actualmente como una enfermedad crónica con elevado nivel de citocinas proinflamatorias en los vasos sanguíneos (Pauletto et al, 2006), y con una expresión de COX-2 incrementada a nivel vascular, se ha asociado con cambios en las respuestas vasculares como el deterioro de las respuestas vasodilatadoras endotelio dependiente o el incremento de las respuestas vasoconstrictoras a diferentes agonistas (García-Cohen et al., 2000; Hernanz et al., 2003).

La administración de inhibidores de la ciclooxigenasa restituye la capacidad vasodilatadora dependiente del endotelio en ratas SHR, sugiriendo que la alteración en la relajación se debe en parte a la liberación concomitante de vasoconstrictores. La inhibición de eNOS y el uso de ACh inducen una contracción dependiente del endotelio en arterias aisladas de muchas especies, incluyendo la rata (Rees et al 1989b), el conejo (Palmer et al., 1987), el perro (Katusic et al, 1990) o el hombre (Yang et al, 1991), indicando que la ACh podría liberar factores contracturantes derivados de la vía de la ciclooxigenasa. Nuestros resultados indican que la ACh produjo una respuesta contracturante en anillos de aorta de ratas SHR de 12 semanas previamente incubadas con L-NAME que fue menor en el grupo que recibió pravastatina. Para comprobar si esa diferencia se debía a una disminución en la

producción de isoprenoides mediante una alteración en la expresión COX-2, analizamos esta enzima mediante western blotting en muestras de aorta y observamos que la intensidad de la banda de 72 kDa, correspondiente a la proteína COX-2, era superior en el grupo control respecto al tratado. Otro dato a favor de esta hipótesis es que la respuesta relajante a ACh en presencia de indometacina se mejoró como consecuencia del tratamiento.

Los prostanoides liberados por la vía de la ciclooxigenasa pueden producir efectos contracturantes mediante la activación del receptor de tromboxano (TP). En las curvas concentración respuesta con un análogo del tromboxano (U46619) hemos visto que la respuesta contráctil era menor en el grupo tratado que en el grupo control. Si tenemos en cuenta que los mecanismos de señalización implicados en la respuesta a este agonista necesitan de la activación de Rho cinasa podremos explicar el efecto de pravastatina a este nivel.

Estos resultados pueden explicar los efectos protectores de la pravastatina en la disfunción endotelial de la hipertensión. Otros estudios en los que se usaron otras estatinas demostraron hallazgos similares a los nuestros. En el estudio de Sotomayor (de Sotomayor et al., 2005) se demostró que el tratamiento crónico de ratas Wistar con simvastatina redujo la expresión de COX-2 pero a diferencia de nuestros resultados no encontraron una alteración de la respuesta mediada por el receptor TP, estas diferencias podrían deberse bien a la propia estatina o al modelo experimental utilizado. En otro estudio en conejos dislipidémicos tratados con atorvastatina durante 14 semanas, se muestra una reducción de la respuesta contracturante a ACh en anillos incubados con L-NAME (Maeso et al., 2000). También, en células endoteliales humanas, la incubación con simvastatina y atorvastatina provocó una reducción de la expresión de COX-2 atribuida a la alteración de la actividad de Rho que producen las estatinas (Massaro et al., 2010).

En arteria aorta, la vasodilatación independiente del endotelio inducida por nitroprusiato sódico no se vio afectada por pravastatina en ninguno de los tres grupos, indicando que la disfunción endotelial y su mejoría por pravastatina se debe a cambios en la biodisponibilidad de NO, más que a cambios en la sensibilidad del músculo liso vascular a NO. Aquí cabe destacar que la relajación a NTP fue mayor

en WKY que en SHR y también fue mayor en las ratas con menos edad, indicando que la hipertensión también produce alteraciones en las CMLV.

Es bien conocido que en arterias de conductancia la relajación a ACh está mediada mayoritariamente por la acción del NO, mientras que en arterias de resistencia, como son las renales o las mesentéricas, la relajación inducida por ACh y agentes relacionados depende, además, de otros factores relajantes derivados del endotelio (Cohen, 1995; Pieper, 1998). Aunque se sabe que la ACh es un potente vasodilatador a nivel renal (Lerman y Rodríguez-Portel, 2001), los mecanismos implicados en la respuesta aún no están claramente definidos.

En los experimentos realizados con riñones perfundidos, pudimos constatar que el proceso hipertensivo afecta negativamente a la función endotelial ya que la relajación a ACh fue mayor en las ratas normotensas que en las hipertensas, además esa disfunción se agrava a medida que progresa la hipertensión. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con pravastatina mejoró la función endotelial en arterias renales de ratas SHR de 12 y 24 semanas. En las ratas normotensas el tratamiento no afectó a la respuesta endotelio dependiente. Tampoco observamos diferencias en las respuestas a NTP y a FE entre los diferentes grupos de estudio.

Las respuestas relajantes se estudiaron también en anillos de arterias de resistencia pertenecientes a la tercera rama del lecho vascular mesentérico. El tratamiento mejoró significativamente la respuesta a ACh solamente en las ratas de 24 semanas. A diferencia de los ensayos llevados a cabo en arteria aorta, en este lecho vascular no evaluamos la expresión de COX y eNOS, pero en un trabajo reciente se ha descrito una sobreexpresión de COX-2 así como la participación de prostanoídes contracturantes en la disfunción endotelial observada en arterias mesentéricas de ratas SHR. Los autores indican que el tratamiento con atorvastatina mejora la relajación dependiente del endotelio a través de una reducción en la expresión de COX-2. También pudieron demostrar por primera vez que esta estatina puede inducir la vía Akt-eNOS en arterias mesentéricas, mecanismo por lo cual las estatinas podrían recuperar la biodisponibilidad del óxido nítrico en arterias de resistencia (Viridis et al., 2009).

Otro de los objetivos de este trabajo era determinar si la administración crónica de pravastatina influía sobre los procesos de remodelado cardiovascular propios de la HTA. Está demostrado que la hipertensión es el factor etiológico más importante en la aparición de infarto y que la hipertrofia del ventrículo izquierdo es el principal factor de riesgo de ésta y otras patologías cardiovasculares (Kannel et al., 1987). La hipertrofia ventricular, mediada principalmente por la hipertrofia de los miocitos, se desarrolla de forma progresiva en las ratas SHR y está asociada a la acumulación patológica de tejido fibrótico en el intersticio cardiaco (Brilla, 2000). La presión arterial elevada es un elemento clave en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, sin embargo la HTA no siempre explica el incremento de la masa del ventrículo izquierdo, puesto que se ha observado hipertrofia en individuos normotensos (Rowlands et al., 1982; Dunn et al., 1990).

En nuestros experimentos pudimos comprobar que la hipertrofia del corazón, valorada como HVI, de las ratas hipertensas era significativamente mayor que la de las ratas WKY y que se acompañaba de un tamaño mayor de los cardiomiocitos y de una deposición mayor de colágeno. Pravastatina disminuyó la hipertrofia ventricular de manera significativa en las ratas SHR, mientras que en las ratas WKY, que presentan un índice de hipertrofia bajo, no se detectó ningún cambio con el tratamiento. La reducción del índice de hipertrofia se acompañó de reducción en el área de los cardiomiocitos y del porcentaje de fibrosis intersticial. Algunos mediadores peptídicos como Ang II y ET-1, producidos localmente en exceso en hipertensión, están implicados en la respuesta hipertrófica del corazón. Lee y col. demostraron una reducción de la hipertrofia de los cardiomiocitos en ratas SHR tratadas con pravastatina, que atribuyen a una reducción de la expresión del ARNm de ET-1 (Lee et al., 2005). Tanto Ang II como ET-1 pueden ejercer sus efectos tróficos a través de vías de señalización que involucran a Rho cinasa (Kuwahara et al., 1999; Higashi et al., 2003; Hunter et al., 2009). Las estatinas mediante la inhibición de la síntesis de los isoprenoides podrían alterar la respuesta inducida por estos agonistas.

Es bien sabido que la hipertrofia acompañada por fibrosis es una causa importante de disfunción cardiaca, por lo que nos pareció interesante cuantificar la

fibrosis intersticial. Para ello realizamos cortes histológicos que después teñimos con rojo sirio, observando una gran diferencia en la fracción de volumen del colágeno entre las ratas SHR y WKY. El tratamiento redujo de manera significativa este parámetro en ambos grupos de animales. Para profundizar en los mecanismos de acción por los cuales la pravastatina podría ejercer este efecto hemos determinado mediante western blot algunos factores implicados en el proceso fibrótico. Nuestros resultados mostraron que pravastatina reduce de la expresión de colágeno-I y fibronectina.

El desarrollo de la fibrosis y el remodelado cardiaco está relacionado con un “turnover” alterado de la matriz extracelular. PAI-1 es un importante regulador del metabolismo del colágeno, puesto que es capaz de inhibir las metaloproteinasas encargadas de su degradación. Se ha observado que ratones deficientes en PAI-1 muestran una menor formación de tejido fibrótico (Chuang-Tsai et al., 2003). Además diversas estatinas, entre ellas la pravastatina, han mostrado buena capacidad para disminuir la expresión de PAI-1 en diferentes sistemas *in vitro* (Lopez et al., 2000; Mussoni et al., 2000; Ishibashi et al., 2002; Swiatkowska et al., 2002). PAI-1 se expresa en diversos tejidos (aorta, riñón, corazón, etc) y de forma más importante en SHR que en WKY (Chen et al., 2000; Naito et al. 2003). Cuando cuantificamos este factor en tejido cardiaco pudimos comprobar las diferencias entre animales control normotensos e hipertensos. Estos resultados muestran un paralelismo con los observados en los cortes histológicos teñidos con rojo sirio. La disminución de la expresión de PAI-1 observada en las ratas SHR después del tratamiento con pravastatina podría ser la responsable de los cambios observados en la deposición de colágeno.

La hipertensión también causa un proceso de remodelado que, en vasos de conductancia como la aorta, da lugar a un engrosamiento de la pared que puede ir acompañado o no de un incremento en el lumen, mientras que en la mayoría de los lechos vasculares de resistencia se observa una disminución de la luz vascular (Galderisi y de Divitiis, 2008). Sabemos que esta alteración no se debe únicamente al crecimiento vascular, sino que puede estar implicado también el denominado

“remodelado eutrófico”, proceso en el que tiene lugar un reordenamiento de la misma cantidad del material (Mulvany, 2005).

Cuando analizamos los cambios morfológicos producidos en los vasos de los grupos de animales control utilizados en este trabajo, observamos cómo las aortas de ratas SHR experimentan un remodelado hipertrófico hacia fuera, lo cual conlleva un ligero incremento en el lumen y un incremento significativo en el  $W_m$  y en el CSA en las SHR de 24 y 12 semanas. El tratamiento redujo estas alteraciones en ambos grupos llegando en el caso de las ratas más jóvenes a valores similares a las de WKY. En el caso de las ratas con más edad eso no se tradujo en una mejoría en la reactividad de este lecho vascular. Según nuestra experiencia, no siempre la mejoría de los parámetros morfométricos va acompañada de una mejoría en la funcionalidad vascular y viceversa. En este sentido, después de un tratamiento de 8 semanas llevado a cabo con astaxantina en SHR pudo observarse una reducción del grosor de la pared sin que existiera una mejoría en la disfunción endotelial (Monroy, 2008), mientras que otro tratamiento similar con zofenopril mostró una mejoría en la disfunción endotelial sin que existiera una reducción de las alteraciones debidas al remodelado vascular (Gómez-Roso et al., 2009).

En este trabajo, al igual que en trabajos previos de nuestro grupo, (Guerrero et al., 2006) las arterias intrarrenales de ratas SHR presentaron una reducción del lumen y un incremento del grosor de la pared respecto a las ratas WKY, lo que indica un proceso de remodelado. El tratamiento con pravastatina revirtió parcialmente este proceso al incrementar la luz de los vasos y reducir su grosor en las ratas SHR de 24 semanas.

Las enfermedades cardiovasculares son patologías que a menudo se asocian con el estrés oxidativo que da lugar a un daño sistémico generado por los radicales libres en diferentes tejidos (corazón, vasos sanguíneos, riñón,...). La enzima NADPH-oxidasa se considera la fuente más importante de  $O_2^-$  en la pared vascular y su expresión y actividad están reguladas al alza en estados que implican riesgo cardiovascular como la hipertensión o la hipercolesterolemia (Selemidis et al., 2008).

En ratas SHR se manifiesta un incremento en la generación del  $O_2^-$  mediado por NADPH-oxidasa en arterias de resistencia, vasos de conductancia y riñón (Zalba

et al., 2000). Un exceso en la generación de este anión se relaciona de forma crucial con la disminución de NO asociado a la disfunción endotelial en hipertensión clínica y experimental.

Al determinar los niveles basales de  $O_2^{\cdot -}$  en arteria aorta de ratas SHR no encontramos diferencias en los grupos tratados frente a sus respectivos controles pero cuando la producción de estos radicales se estimula con NADPH observamos que el tratamiento disminuía significativamente la señal luminiscente. Cuando estos experimentos se llevaron a cabo con aortas de ratas WKY no se observaron diferencias con el tratamiento, ni en los niveles basales ni tras la estimulación con NADPH. Nos llamó la atención que los valores de luminiscencia no mostraran diferencias entre SHR y WKY, hecho puesto de manifiesto en numerosos trabajos (Álvarez et al., 2008; Sánchez et al., 2006; Zalba et al., 2000). Nosotros pensamos que esto se debe a que los ensayos no pudieron llevarse a cabo simultáneamente y nuestra experiencia nos demuestra que éste es un factor importante dada la variabilidad del método, por ello los ensayos entre controles y tratados los realizamos siempre a la vez.

Como hemos mencionado antes, las estatinas inhiben la síntesis de isoprenoides que sirven de anclaje lipídico para GTPasas como Rac, proteína clave para la activación de NADPH-oxidasa (Rinckel et al., 1999). Esta enzima está formada por diferentes subunidades catalíticas, unas en la membrana y otras en el citosol y es necesaria la participación de Rac para la traslocación de las unidades citosólicas a la membrana y la activación de la enzima (Sarfstein et al., 2004; Selemidis et al., 2008). En este sentido, creemos que pravastatina podría ejercer parte de su acción antioxidante al interferir con Rac, sin embargo, no podemos descartar una alteración en la expresión de algunas subunidades como Nox que otros autores han observado con otras estatinas (Wassmann et al., 2002; Rueckschloss et al., 2001).

Otro indicador del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica que se produce cuando los radicales libres atacan a los lípidos de la membrana y causan daños celulares. El MDA es el aldehído más importante obtenido tras la descomposición de los peróxidos lipídicos. En nuestro estudio hemos observado una reducción de los niveles de MDA en todos los animales tratados. El hecho de que el tratamiento con

pravastatina disminuya los niveles de MDA apoyaría el carácter antioxidante atribuido a esta estatina.

Los estudios para valorar el efecto de la pravastatina después de una administración crónica mostraron efectos muy interesantes en arterias que nos hicieron pensar que podrían estar relacionados con su capacidad antioxidante. Para estudiar de forma directa esta capacidad diseñamos una serie de ensayos *in vitro* en arteria aorta.

El  $O_2^{\cdot-}$  y otros oxidantes participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis y el daño vascular. Como ya hemos comentado, la señalización celular dependiente de NO, incluida la relajación endotelio dependiente, está regulada por  $O_2^{\cdot-}$  y por la familia de enzimas SOD encargadas de catalizar la formación de  $H_2O_2$  y oxígeno molecular a partir del  $O_2^{\cdot-}$  (Lynch et al., 1997). La producción de  $O_2^{\cdot-}$  inducida por incubación con NADPH, medida por quimioluminiscencia, mostró una reducción significativa dosis-dependiente en anillos de aorta incubados previamente con pravastatina, lo que nos muestra la capacidad de esta estatina para actuar como captador de radicales libres.

Se sabe que la NADPH-oxidasa es la principal enzima productora de radicales libres a nivel vascular y que se sobreexpresa en ratas SHR (Guzik et al., 2000; Zalba et al., 2000; Lassègue y Clempus, 2003). Teniendo en cuenta que el  $O_2^{\cdot-}$  reacciona rápidamente con el NO, un exceso de producción de radicales podría ser la responsable de la disminución en la capacidad relajante de la ACh observado en anillos de ratas SHR (Beckman et al., 1990). Nuestros resultados indican que la incubación con pravastatina mejora la disfunción endotelial observada en SHR con cualquiera de los protocolos de incubación. Este efecto podría deberse a la inhibición de la HMG-CoA reductasa, la enzima que regula la síntesis del ácido mevalónico. Al inhibir este paso limitante de la biosíntesis del colesterol, la pravastatina también impide la síntesis de intermediarios isoprenoides, produciendo la inhibición de la geranylgeranilación de Rac 1 y haciendo imposible el desplazamiento de esta GTPasa pequeña a la membrana celular (Nakagami et al., 2003). La inhibición de Rac1 en la membrana celular evitaría la activación de la NADPH-oxidasa (Wassmann et al., 2002). A fin de verificar este punto, se repitieron los experimentos en presencia del

ácido mevalónico y se observó una inhibición parcial del efecto de pravastatina cuando ésta estaba presente en el medio. Sin embargo, cuando se retiró la pravastatina media hora antes de realizar la curva de ACh el ácido mevalónico fue capaz de revertir totalmente el efecto. Teniendo en cuenta estos resultados, parece que la pravastatina puede actuar en parte por mecanismos independientes de la inhibición de la HMG-CoA reductasa. Como hemos mencionado anteriormente, en SHR hay una alta producción de  $O_2^-$  por lo que pensamos que pravastatina puede actuar como un captador de radicales libres neutralizando una parte de los  $O_2^-$  responsables de la disfunción endotelial. El hecho de que la pravastatina redujera la producción de  $O_2^-$  estimulada por NADPH y medido por quimioluminiscencia apoya nuestra hipótesis. Además, el ácido mevalónico, incluso a altas concentraciones, no pudo inhibir este efecto.

Aunque las propiedades antioxidantes de las estatinas están ampliamente descritas (Shishehbor et al., 2003; Briones et al., 2009; Kassan et al., 2009) hay pocos trabajos que estudian el efecto scavenger de las mismas (Yamamoto et al., 1998; Franzoni et al., 2003). Por ello realizamos una serie de experimentos que nos permitieran determinar si pravastatina poseía esta actividad.

Como describen Tarpey y col (Tarpey et al., 1999), altas dosis de lucigenina causan un proceso de óxido-reducción que conduce a la formación de  $O_2^{\cdot\cdot}$  *in vitro* y, como consecuencia la pérdida de la relajación dependiente del endotelio. Utilizando anillos de aorta de ratas Wistar incubadas con 250  $\mu$ M de lucigenina, observamos una pérdida del 75% en la relajación a ACh si comparamos con la respuesta que se produce en anillos control, lo cual está de acuerdo con lo anteriormente descrito por estos autores. Además, la presencia de SOD restauró la respuesta a ACh, lo que confirma que lucigenina incrementa la producción vascular de  $O_2^{\cdot\cdot}$ . Pravastatina dio lugar a una respuesta muy similar a la obtenida en presencia de SOD, lo que apoya nuestra hipótesis de una acción “scavenger”.

Las estatinas regulan la expresión de eNOS y prolongan la vida media de su ARNm por la inhibición de la síntesis de isoprenoides (Wolfrum et al., 2003) hecho que nosotros también hemos puesto de manifiesto en arteria aorta tras el tratamiento crónico con pravastatina. Abe y col (Abe et al., 2006) también reportaron que la

pravastatina, en un cultivo de células endoteliales, revierte la reducción en la expresión de eNOS causada por el estrés oxidativo. Los resultados de nuestro estudio indican que el efecto antioxidante de pravastatina, en anillos de aorta incubados con lucigenina, no estaría relacionado con esta acción, porque el ácido mevalónico no pudo revertir este efecto y la incubación con pravastatina sola no modificó la relajación vascular a ACh. Por otra parte, los resultados obtenidos con NTP utilizando el mismo protocolo fueron similares a los observados con la ACh, lo que apoya un efecto captador de radicales directo de pravastatina.

La incubación de los anillos de aorta con alta concentración de lucigenina y la posterior medida de  $O_2^{\cdot-}$  por quimioluminiscencia nos indica un incremento importante de la señal que no aparece en presencia de SOD o de pravastatina, de nuevo el efecto de pravastatina no se revierte con ácido mevalónico. Comparando los resultados de ambos experimentos, hemos observado una buena correlación entre la respuesta de relajación y la señal de quimioluminiscencia.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo con pravastatina en ratas y nuestra experiencia en ensayos de reactividad vascular con arterias humanas, nos planteamos ampliar el estudio de dicha estatina a estos lechos vasculares. Es conocido que los resultados clínicos a largo plazo de la cirugía de revascularización miocárdica dependen en gran parte de la capacidad de perfusión y la permeabilidad a lo largo del tiempo de los conductos utilizados (Loop et al., 1986; He, 2001). Desde hace tiempo se conoce que la arteria mamaria interna, especialmente cuando se utiliza para revascularizar la cara anterior del corazón, tienen una permeabilidad a largo plazo muy superior a los injertos venosos y que su utilización sobre la arteria descendente anterior se asocia a una menor recidiva de los eventos isquémicos. Este hecho ha motivado que a lo largo de los últimos años se haya ampliado la utilización de conductos arteriales, recurriendo a la arteria mamaria interna o, con más frecuencia, a la arteria radial. Sin embargo, los conductos arteriales, especialmente la arteria radial, son más susceptibles de sufrir vasoespasmo intra o postoperatorio, circunstancia que puede comprometer la perfusión del miocardio en el postoperatorio inmediato y la permeabilidad de los conductos a medio y largo plazo. El vasoespasmo puede producirse por la acción de diversas sustancias vasoactivas

liberadas por la pared vascular. Para prevenir esta complicación se han utilizado durante la intervención diferentes fármacos vasodilatadores como papaverina, antagonistas del calcio, nitroglicerina, etc. (Cable et al., 1998; He y Yang., 2000; He et al., 2008).

Hay evidencias de que tras la cirugía de *bypass* aorto-coronario se produce una acumulación excesiva de isoprostanos en sangre que podrían estar implicados en la patogénesis del vasoespasmo (Mehlhorn et al., 2003; Cavalca et al., 2006). Estos prostanoides son agentes contracturantes potentes que ejercen su efecto mediante la activación del receptor TP, que requiere la Rho cinasa para su activación. Recientemente también se ha descrito una mayor expresión del ARNm de RhoA/Rho cinasa, una mayor cantidad de estas proteínas y una mayor actividad de este complejo en arterias radiales que en mamarias, sugiriendo que esta vía de señalización podría ser la responsable de la respuesta al vasoespasmo en aquel lecho vascular (Kun et al., 2009). Bloquear esta vía podría ser fundamental para abordar este problema.

Dado que las estatinas interfieren en las vías de señalización de Ras, otro de los objetivos de nuestro trabajo era averiguar el efecto de pravastatina sobre la reactividad vascular de algunos lechos arteriales, pensando que podrían ejercer un papel interesante en la prevención del vasoespasmo.

En un trabajo anterior (Kassan, 2007) habíamos estudiado la respuesta de arterias mamarias y radiales, procedentes de pacientes sometidos a cirugía de *bypass*, a agentes relajantes como ACh y NTP y a agentes contracturantes como FE y U46619 y habíamos constatado que, a pesar de la heterogeneidad de las muestras (edad, sexo, patologías asociadas, tratamiento farmacológico, etc.), las respuestas eran bastante reproducibles. A pesar de ello, los ensayos destinados a valorar el efecto de pravastatina solo se llevaron a cabo cuando disponíamos, al menos, de 2 anillos del mismo paciente para utilizar uno como control. En este caso las arterias se incubaron con pravastatina durante 3 horas, ya que los mejores resultados en ratas se obtuvieron con este protocolo y, por otra parte, la disponibilidad limitada de las muestras no nos permitió ensayar otros periodos de incubación. En arterias mamarias ensayamos FE y U46619, mientras que el menor número de muestras de arterias

radiales sólo nos permitió ensayar uno de ellos. Nos pareció oportuno seleccionar U46619 dada la importancia de los prostanoïdes en el desarrollo del vasoespasmo. La pravastatina redujo significativamente la respuesta a U46619, independientemente del lecho vascular y no produjo ningún efecto en la respuesta a FE. Si tenemos en cuenta las diferentes vías de señalización de estos 2 agonistas (activación de PLC en el caso de los agonistas  $\alpha$ -1 y activación de la vía Rho/Rho cinasa en el caso de los agonistas del receptor TP) no es de extrañar que pravastatina sólo redujera la respuesta al análogo del tromboxano y que este efecto se revirtiera completamente en presencia de ácido mevalónico.

Por otra parte, nuestros resultados indican que en los anillos control la relajación a ACh fue mayor en las arterias radiales que mamarias y que la pravastatina mejoró dicha respuesta en mayor grado en las primeras. Son muy pocos los trabajos en los que se estudia los efectos de las estatinas en arterias humanas *in vitro*, sin embargo Nakamura y colaboradores, incubando con cerivastatina obtuvieron, al igual que nosotros, una mejoría en la respuesta relajante a ACh que también fue mayor cuando se emplearon arterias radiales (Nakamura et al., 2003). Aunque somos conscientes de que es muy aventurado extrapolar los resultados obtenidos en animales a humanos, podríamos especular que este efecto de pravastatina podía llevarse a cabo a través de la regulación de la eNOS, la alteración de la función de la NADPH-oxidasa o por su efecto "scavenger". Aunque se necesitan ensayos adicionales para confirmar cualquiera de estos mecanismos, el hecho de que el ácido mevalónico fuera incapaz de revertir totalmente el efecto de pravastatina sobre la función endotelial y que la producción basal de radicales superóxido se redujera después de la incubación, nos indica que el último de los mecanismos debe tenerse en cuenta.

*CONCLUSIONES*



1. El tratamiento crónico con 20 mg/Kg/día de pravastatina sobre la presión arterial es diferente en función del grupo de animales tratados. No tiene efecto en ratas normotensas, impide la subida en SHR jóvenes con hipertensión incipiente y la reduce, ligera pero significativamente, en SHR más viejas con hipertensión claramente establecida.
2. El tratamiento con pravastatina mejora la función endotelial tanto en arterias de conductancia (aorta) como de resistencia (arterias mesentéricas, lecho vascular renal). En arteria aorta este efecto se debe a una reducción en la producción de radicales superóxido, una menor contribución de prostanoïdes contracturantes y una mayor producción de NO.
3. La administración crónica de pravastatina reduce tanto la fibrosis como la hipertrofia cardíaca, y en vasos de conductancia (arteria aorta) y de resistencia (lecho vascular renal) revierte las alteraciones en los parámetros morfo-histológicos que indican procesos de remodelado asociados a la hipertensión.
4. El tratamiento con pravastatina amortigua el estrés oxidativo generado por la hipertensión, ya que reduce la producción de aniones superóxido estimulada por la NADPH-oxidasa. Además, pravastatina es capaz de actuar como “scavenger” eliminando los radicales libres presentes en el medio.
5. Pravastatina mejora *in vitro* la función endotelial de arterias mamarias y radiales humanas procedentes de pacientes sometidos a *bypass* coronario. La reducción de la respuesta a prostanoïdes contracturantes y una menor producción de radicales superóxido están implicados en este efecto.
6. La utilización de pravastatina puede resultar beneficiosa para el control de las enfermedades cardiovasculares independientemente de su efecto hipolipemiente.



## *BIBLIOGRAFÍA*



- Abe Y, Izumi T, Urabe A, Nagai M, Taniguchi I, Ikewaki K, Mochizuki S. Pravastatin prevents myocardium from ischemia-induced fibrosis by protecting vascular endothelial cells exposed to oxidative stress. **Cardiovasc Drugs Ther.** 2006; 20:273-80.
- Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. **J Hypertens.** 2005; 23:1025-36.
- Álvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. **Br J Pharmacol.** 2008; 153:926-35.
- Álvarez FH, Gómez Duque M, Ortiz Vargas JC, Velásquez B, Arévalo M, Enrique M, Sánchez-Reyes L, Fanghänel G. Efecto de las estatinas más allá del colesterol. **Revista de Endocrinología y Nutrición.** 2006; 14:73-88.
- Álvarez E, Rodiño-Janeiro BK, Uceda-Somoza R, González-Juanatey JR. Pravastatin counteracts angiotensin II-induced upregulation and activation of NADPH oxidase at plasma membrane of human endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2010; 55:203-12.
- Ardanaz-Martínez N. Efectos cardiovasculares del tratamiento crónico con terazosina en ratas espontáneamente hipertensas. **Tesis doctoral. Universidad Salamanca.** 2003.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. **John Wiley & Sons.** 1987.
- Badyal DK, Dadhich AP, Lata H. Animals models of hypertension and effect of drugs. **Indian J Pharmacol.** 2003; 35:349-362.
- Banegas JR, Jovell A, Abarca B, Aguilar Diosdado M, Aguilera L, Aranda P, Bertoméu V, Capilla P, Conthe P, De Alvaro F, Fernández-Pro A, Formiguera X, Frías J, Guerrero L, Llisterri JL, Lobos JM, Macías JF, Martín De Francisco AL, Millán J, Morales JC, Palomo V, Roca-Cusachs A, Román J, Sanchis C, Sarriá A, Segura J, De La Sierra A, Verde L, Zarco J, Ruilope LM. Hypertension and health policy in Spain. **Med Clin (Barc).** 2009; 132:222-9.
- Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kB: A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Eng J Med.** 1997; 336:1066-71.

## 164 Bibliografía

- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1990; 87:1620-4.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**. 1996; 271:C1424-37.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev**. 2007; 87:245-313.
- Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, Shah AM. Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation**. 2002; 105:293-6.
- Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. **Cardiovasc Res**. 2005; 65:16-27.
- Brilla CG. Renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial fibrosis. **Cardiovasc Res**. 2000; 47:1-3.
- Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, Rodríguez-Díez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. **Hypertension**. 2009; 54:142-9.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. **Circ Res**. 2001; 89:866-73.
- Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, Blevins LS, Nadeau JH, Meranze SG, Vaughan DE. Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. **J Clin Endocrinol Metab**. 2000; 85:336-44.
- Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol Sci**. 2002; 23:374-80.
- Busse R, Forstermann U, Matsuda H, Pohl U. The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia. **Pflügers Arch**. 1984; 401:77-83.
- Cable DG, Caccitolo JA, Pearson PJ, O'Brien T, Mullany CJ, Daly RC, Orszulak TA, Schaff HV. New approaches to prevention and treatment of radial artery graft vasospasm. **Circulation**. 1998; 98:II15-22.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res**. 2000; 87:840-4.

- Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. **N Engl J Med.** 2004; 350:1495-504.
- Carroll KK, Guthrie N, Ravi K. Dolichol: function, metabolism, and accumulation in human tissues. **Biochem Cell Biol.** 1992; 70:382-4.
- Cavalca V, Sisillo E, Veglia F, Tremoli E, Cighetti G, Salvi L, Sola A, Mussoni L, Biglioli P, Folco G, Sala A, Parolari A. Isoprostanes and oxidative stress in off-pump and on-pump coronary bypass surgery. **Ann Thorac Surg.** 2006; 81:562-7.
- Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2003; 100:1426-31.
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. **Br J Pharmacol.** 1988; 95:1165-74.
- Chen HC, Bouchie JL, Perez AS, Clermont AC, Izumo S, Hampe J, Feener EP. Role of the angiotensin AT(1) receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2000; 20:2297-302.
- Chuang-Tsai S, Sisson TH, Hattori N, Tsai CG, Subbotina NM, Hanson KE, Simon RH. Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1. **Am J Pathol.** 2003; 163:445-52.
- Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. **Science.** 1983; 221:273-4.
- Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. **Prog Cardiovasc Dis.** 1995; 38:105-28.
- Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Methods.** 1999; 232:3-14.
- de Andrade Zorzi RL, Meirelles Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effect of enalapril in spontaneously hypertensive rats cardiac remodeling with nitric oxide synthesis blockade. **J Cell Mol Med.** 2002; 6:599-608.

- de Sotomayor MA, Pérez-Guerrero C, Herrera MD, Jimenez L, Marín R, Marhuenda E, Andriantsitohaina R. Improvement of age-related endothelial dysfunction by simvastatin: effect on NO and COX pathways. **Br J Pharmacol.** 2005; 146:1130-8.
- Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. **Prog Cardiovasc Dis.** 1997; 39:287-324.
- Dunn FG, McLenachan J, Isles CG, Brown I, Dargie HJ, Lever AF, Lorimer AR, Murray GD, Pringle SD, Robertson JW. Left ventricular hypertrophy and mortality in hypertension: an analysis of data from the Glasgow Blood Pressure Clinic. **J Hypertens.** 1990; 8:775-82.
- Edwards JE, Moore RA. Statins in hypercholesterolemia: A dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomised, double blind trials. **BMC Fam Pract.** 2003; 4:18.
- Egido J, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Blanco-Colio LM, Ortego M, Suzuki Y. Transcription factor KB (NF-KB) and cardiovascular disease. **Cardiovascular Risk Factors.** 2000; 9:92-103.
- Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **J Lipid Res.** 1992; 33:1569-82.
- Ernst E. The role of fibrinogen as a cardiovascular risk factor. **Atherosclerosis.** 1993; 100:1-12.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. **Nature.** 2002; 420:629-35.
- Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2006; 291:H985-1002.
- Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. **Circulation.** 2001; 103:113-18.
- Fortuño A, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Oxidative stress and vascular remodelling. **Exp Physiol.** 2005; 90:457-62.
- Franzoni F, Quiñones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galetta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. **Int J Cardiol.** 2003; 90:317-21.

- Freeman BA, Crapo J. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. **Lab Invest.** 1982; 47:412-26.
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB J.** 1989; 3:2007-18.
- Galderisi M, de Divitiis O. Risk factor-induced cardiovascular remodeling and the effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2008; 51:523-31.
- García-Cohen EC, Marín J, Díez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodríguez-Martínez MA. Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the rat aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. **J Pharmacol Exp Ther.** 2000; 293:75-81.
- Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest.** 1989; 83:1774-7.
- Ge CJ, Hu SJ, Wu YS, Chen NY. Effects of atorvastatin on vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. **J Zhejiang Univ Sci.** 2003; 4:612-5.
- Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. **N Engl J Med.** 1994; 330:1431-8.
- Gómez-Gerique JA, Ros E, Oliván J, Mostaza JM, Vilardell M, Pinto X, Civeira F, Hernández A, Da Silva PM, Rodríguez-Botaro A, Zambón D, Lima J, Díaz C, Arístegui R, Sol JM, Cháves J, Hernández G, ATOMIX investigators. Effect of atorvastatin and bezafibrate on plasma levels of C-reactive protein in combined (mixed) hyperlipidemia. **Atherosclerosis.** 2002; 162:245-51.
- Gómez-Roso M. Efectos de Zofenopril sobre el estrés oxidativo y el remodelado cardiovascular en ratas hipertensas. **Tesis doctoral. Universidad Salamanca.** 2008.
- Gómez-Roso M, Montero MJ, Carrón R, Sevilla MA. Cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats are improved by chronic treatment with zofenopril. **Br J Pharmacol.** 2009; 158:1911-21.
- Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. **Am J Clin Nutr.** 2006; 83:461S-465S.
- Griffith TM, Chaytor AT, Taylor HJ, Giddings BD, Edwards DH. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002; 99:6392-7.

- Guerrero EI, Ardanaz N, Sevilla MA, Arévalo MA, Montero MJ. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. **J Hypertens**. 2006; 24:151-8.
- Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discov Today**. 2006; 11:524-33.
- Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circ Res**. 2000; 86:E85-90.
- Halcox JP, Deanfield JE. Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy. **Circulation**. 2004; 109:II42-8.
- Harris MB, Blackstone MA, Sood SG, Li C, Goolsby JM, Venema VJ, Kemp BE, Venema RC. Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2004; 287:H560-6.
- He GW. Arterial grafts for coronary surgery: vasospasm and patency rate. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2001; 121:431-3.
- He GW, Fan L, Furnary A, Yang Q. A new antispastic solution for arterial grafting: nicardipine and nitroglycerin cocktail in preparation of internal thoracic and radial arteries for coronary surgery. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2008; 136:673-80.
- He GW, Yang CG. Comparative study on calcium channel antagonists in the human radial artery: clinical implications. **J Thorac Cardiovasc Surg**. 2000; 119: 94-100.
- Heineke J, Molkenin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2006; 7:589-600.
- Henrion D, Dechaux E, Dowell FJ, Maclour J, Samuel JL, Levy BI, Michel JB. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2. **Br J Pharmacol**. 1997; 121:83-90.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. **Lancet**. 2002; 360:7-22.

- Hernández-Pérrera O, Pérez-Sala D, Soria E, Lamas S. Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells. **Circ Res.** 2000; 87:616-22.
- Hernanz R, Alonso MJ, Briones AM, Vila E, Simonsen U, Salaices M. Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. **Br J Pharmacol.** 2003; 140:671-80.
- Higashi M, Shimokawa H, Hattori T, Hiroki J, Mukai Y, Morikawa K, Ichiki T, Takahashi S, Takeshita A. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system. **Circ Res.** 2003; 93:767-75.
- Hunter JC, Zeidan A, Javadov S, Kilić A, Rajapurohitam V, Karmazyn M. Nitric oxide inhibits endothelin-1-induced neonatal cardiomyocyte hypertrophy via a RhoA-ROCK-dependent pathway. **J Mol Cell Cardiol.** 2009; 47:810-18.
- Hyvelin JM, Howell K, Nichol A, Costello CM, Preston RJ, McLoughlin P. Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. **Circ Res.** 2005; 97:185-191.
- Ishibashi T, Nagata K, Ohkawara H, Sakamoto T, Yokoyama K, Shindo J, Sugimoto K, Sakurada S, Takuwa Y, Teramoto T, Maruyama Y. Inhibition of Rho/Rho-kinase signaling downregulates plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in cultured human monocytes. **Biochim Biophys Acta.** 2002; 1590:123-30.
- Jiménez W, Poo JL, Leivas A. Endothelin and systemic, renal, and hepatic hemodynamic disturbances in cirrhosis. En *Therapy in liver diseases. The Pathophysiological basis of therapy.* **Ed Masson.** 1997b; 21-5.
- Jiménez W, Ros J, Morales-Ruiz M, Leivas A. Nitric oxide synthases, nitric oxide, prostaglandins, and endothelins in chronic liver diseases: their contribution to portal hypertension and ascitis. *Therapy in liver diseases. The pathophysiological basis of therapy.* **Ed Masson.** 1997a; 27-33.
- Jukema JW, Bruschke AV, Van Booven AJ, Reiber JH, Bat ET, Zwinderman AH, Cansen H, Boerma GJ, Van Rappard FM, Lie KL. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The regression growth evaluation statin study (REGRESS). **Circulation.** 1995; 91:2528-40.

## 170 Bibliografía

- Kannel WB, Levy D, Cupples LA. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study. **J Cardiovasc Pharmacol.** 1987; 10:S135-40.
- Karatzis E, Lekakis J, Papamichael C, Andreadou I, Cimponeriu A, Aznaouridis K, Papaioannou TG, Protogerou A, Mavrikakis M. Rapid effect of pravastatin on endothelial function and lipid peroxidation in unstable angina. **Int J Cardiol.** 2005; 101:65-70.
- Kassan M. Reactividad de lechos vasculares humanos utilizados como puentes aorto-coronarios. **Trabajo de Grado.** 2007.
- Kassan M, Montero MJ, Sevilla MA. Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. **Br J Pharmacol.** 2009; 158:541-7.
- Katusic ZC, Moncada S, Vanhoutte PM. Inhibitory effect of N<sup>G</sup> monomethyl-L-arginine on endothelium dependent relaxations to vasopressin, in Moncada S, Higgs EA (eds): Nitric oxide from L-arginine: A Biorregulatory System. London, **Elsevier Science Publishers BV.** 1990, 69-72.
- Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. **Circulation.** 2000; 101:1130-7.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet.** 2005; 365:217-23.
- Kemp TJ, Aggeli IK, Sugden PH, Clerk A. Phenylephrine and endothelin-1 upregulate connective tissue growth factor in neonatal rat cardiac myocytes. **J Mol Cell Cardiol.** 2004; 37:603-6.
- Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacol rev.** 2000; 52:11-34.
- Kobayashi T, Miyauchi T, Sakai S, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Expression of endothelin-1, ETA and ETB receptors, and ECE and distribution of endothelin-1 in failing rat heart. **Am J Physiol.** 1999; 276:H1197-206.
- Kotseva K, Wood D, De Backer G, De Bécquer D, Pyörälä K, Keil U. EUROASPIRE III: a survey on the lifestyle, risk factors and use of cardioprotective drug therapies in coronary patients from 22 European countries. **Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.** 2009; 16:121-37.

- Kun X, Lefeng W, Rongjing D, Xincun Y. RhoA/ROK pathway related to the mechanism of higher susceptibility to spasm in RA than in IMA. **J Card Surg.** 2009; 24:766-71.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMGCoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat Med.** 2000; 6:1004-10.
- Kuwahara K, Saito Y, Nakagawa O, Kishimoto I, Harada M, Ogawa E, Miyamoto Y, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Izumi T, Kawakami R, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes--possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. **FEBS Lett.** 1999; 452:314-8.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 1970; 227:680-5.
- Lahera V, Cediél E, de las Heras N, Vazquez-Perez S, Sanz-Rosa D, Vazquez-Cruz B, Cachofeiro V. Endothelial dysfunction in hipertensión. **Nefrologia.** 2003; 23:3-12.
- Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2003; 285:R277-97.
- Lee TM, Lin MS, Chou TF, Tsai CH, Chang NC. Effect of pravastatin on development of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2005; 289:H220-7.
- Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ. Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. **Circulation.** 1999; 100: 178-84.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC Jr. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. **N Engl J Med.** 1991; 325:997-1001.
- Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. **J Lab Clin Med.** 2005; 146:160-73.
- Lerman LO, Rodríguez-Porcel M. Functional assessment of the circulation of the single kidney. **Hypertension.** 2001; 38:625-9.

## 172 Bibliografía

- Li JJ. Inflammation in hypertension: primary evidence. **Chin Med J.** 2006; 119:1215-21.
- Liao, J.K. and Laufs, U. Pleiotropic effects of statins. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2005; 45:89-118.
- Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, Stewart RW, Goormastic M, Williams GW, Golding LA, Gill CC, Taylor PC, Sheldon WC. Influence of the internal-mammary artery graft on 10 years survival and other cardiac events. **N Engl J Med.** 1986; 314:1-6.
- Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G. Effect of atorvastatin and fluvastatin on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human endothelial cells. **Atherosclerosis.** 2000; 152:359-66.
- López-Farré A, Montañés I, Millás I, López-Novoa JM. Effect of endothelin on renal function in rats. **Eur J Pharmacol.** 1989; 163:187-9.
- Lüscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang ZH. Endothelium-derived contracting factors. **Hypertension.** 1992; 19:117-30.
- Lusher TF, Tanner FC, Tschudi MR. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. **An Rev Med.** 1993; 44:395-418.
- Lynch SM, Frei B, Morrow JD, Roberts LJ, Xu A, Jackson T, Reyna R, Klevay LM, Vita JA, Keany JF Jr. Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilator function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1997; 17:2975-81.
- Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. **Circulation.** 2003; 108:1567-74.
- Maeso R, Aragoncillo P, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Diaz C, Hernández G, Lahera V, Cachafeiro V. Effect of atorvastatin on endothelium-dependent constrictor factors in dyslipidemic rabbits. **Gen Pharmacol.** 2000; 34:263-72.
- Mallat Z, Gojova A, Sauzeau V, Brun V, Silvestre JS, Esposito B, Merval R, Groux H, Loirand G, Tedgui A. Rho-associated protein kinase contributes to early atherosclerotic lesion formation in mice. **Circ Res.** 2003; 93:884-8.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacol ther.** 1997; 75:111-34.

- Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa T, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002; 290:909-13.
- Masaki T, Yanagisawa M, Goto K. Physiology and pharmacology of endothelins. **Med Res Rev.** 1992; 12:391- 421.
- Masaki T. Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 1995; 35:235-55.
- Masana L. Determinación del riesgo cardiovascular global.¿una utopia? **Med Clin.** 2004; 123:702-3.
- Mason RP, Walter MF, Jacob RF. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function. Role of microdomains and oxidative stress. **Circulation.** 2004; 109:II34-41.
- Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, Carluccio MA, Storelli C, Distante A, De Caterina R. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. **Cardiovasc Res.** 2010; 86:311-20.
- McBride M, Charchar F, Gram. D, Millar W, Strahorn P, Carr F, Dominiczak A. functional genomics in rodent models of hipertensión. **J Physiol.** 2003; 554:56-63.
- Medrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodríguez M. Cardiovascular risk factors in Spanish population: metaanalysis of cross-sectional studies. **Med Clin (Barc).** 2005; 124:606-12.
- Mehlhorn U, Krahwinkel A, Geissler HJ, LaRosee K, Fischer UM, Klass O, Suedkamp M, Hekmat K, Tossios P, Bloch W. Nitrotyrosine and 8-isoprostane formation indicate free radical-mediated injury in hearts of patients subjected to cardioplegia. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 2003; 125:178-83.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.** 1991; 43:109-42.
- Monroy J. Efecto de la astaxantina en la función vascular, remodelado cardiovascular y estrés oxidativo asociados a la hipertensión. **Tesis doctoral Universidad Salamanca.** 2008.
- Mukai Y, Wang CY, Rikitake Y, Liao JK. Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt negatively regulates plasminogen activator inhibitor type 1 expression

- in vascular endothelial cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2007; 292:H1937-42.
- Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. **Hypertension.** 1996; 28:505-6.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res.** 1977; 41:19-26.
- Mulvany MJ. Abnormalities of resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. **Pharmacol Rep.** 2005; 57:144-50.
- Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. **Curr Hypertens Rep.** 2002a; 4:49-55.
- Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News Physiol Sci.** 2002b; 17:105-9.
- Mussoni L, Banfi C, Sironi L, Arpaia M, Tremoli E. Fluvastatin inhibits basal and stimulated plasminogen activator inhibitor 1, but induces tissue type plasminogen activator in cultured human endothelial cells. **Thromb Haemost.** 2000; 84:59-64.
- Naito Y, Tsujino T, Kawasaki D, Okumura T, Morimoto S, Masai M, Sakoda T, Fujioka Y, Ohyanagi M, Iwasaki T. Circadian gene expression of clock genes and plasminogen activator inhibitor-1 in heart and aorta of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **J Hypertens.** 2003; 21:1107-15.
- Nakagami H, Jensen KS, Liao JK. A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms. **Ann Med.** 2003; 35:398-403.
- Nakamura K, Al-Ruzzeh S, Chester AH, Ilsley C, Yacoub MH, Amrani M. Differential in vitro response of the human radial artery versus left internal thoracic artery to cerivastatin: implications to bypass grafting. **Ann Thorac Surg.** 2003; 76:2023-8.
- Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM. Endothelium dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. **J Clin Invest.** 1993; 92:2867-71.
- Nava E, Luscher TF. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. **J Hypertens.** 1995; 13:S39-48.
- Nawawi H, Osman NS, Yusoff K, Khalid BA. Reduction in serum levels of adhesion molecules, interleukin-6 and C-reactive protein following short-term

- low-dose atorvastatin treatment in patients with non-familial hypercholesterolemia. **Horm Metab Res.** 2003; 35:479-85.
- Nawrocki AR, Scherer PE. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. **Cur Opin Pharmacol.** 2004; 4:281-289.
- Needleman P, Isakson PC. The discovery and function of COX-2. **J Rheumatol Suppl.** 1997; 49:6-8.
- Nishikawa Y, Stepp DW, Chilian WM. Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2000; 279:H459-65.
- Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfro KY, Calhoun DA. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. **Circulation.** 2004; 109:2857-61.
- Nohria A, Grunert ME, Rikitake Y, Noma K, Prsic A, Ganz P, Liao JK, Creager MA. Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease. **Circ Res.** 2006; 99:1426-32.
- Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. **Endothelium.** 2004; 11:123-32.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** 1979; 95:351-8.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J.** 1963; 27:282-93.
- Omori H, Nagashima H, Tsurumi Y, Takagi A, Ishizuka N, Hagiwara N, Kawana M, Kasanuki H. Direct in vivo evidence of a vascular statin: a single dose of cerivastatin rapidly increases vascular endothelial responsiveness in healthy normocholesterolemic subjects. **Br J Clin Pharmacol.** 2002; 54:395-99.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 1987; 327:524-6.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med.** 1990; 323:22-7.
- Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc Res.** 2006; 71:247-58.

## 176 Bibliografía

- Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. **J Hypertens**. 2001; 19:415-20.
- Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. **J Biol Chem**. 2005; 280:26714-9.
- Parsaee H, McEwan JR, Sunil J, McDermot J. Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial cells. **Br J Pharmacol**. 1992; 107:1013-9.
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. **Nephrol Dial Transplant**. 2006; 21:850-3.
- Pérez NG, Escudero EM, Portiansky EL, Camilión de Hurtado MC, Cingolani HE. Regresión and prevention of myocardial hypertrophy and fibrosis by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition. **J Mol Cell Cardiol**. 2002; 34: A-17.
- Petersson J, Zygmunt PM, Brandt L, Högestätt ED. Substance P-induced relaxation and hyperpolarization in human cerebral arteries. **Br J Pharmacol**. 1995; 115:889-94.
- Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. **J Appl Physiol**. 2001; 91:497-503.
- Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. **Hypertension**. 1998; 31:1047-60.
- Pi-Sunyer F. The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk. **Clin Cornestone**. 2006; 8:S14-23.
- Plehn JF, Davis BR, Sacks FM, Rouleau JL, Pfeffer MA, Bernstein V, Cuddy TE, Moyé LA, Piller LB, Rutherford J, Simpson LM, Braunwald E. Reduction of stroke incidence after myocardial infarction with pravastatin. The cholesterol and recurrent events (CARE) study. **Circulation**. 1999; 9:216-23.
- Pompilio G, Rossoni G, Alamanni F, Tartara P, Barajon I, Rumio C, Manfredi B, Biglioli P. Comparison of endothelium-dependent vasoactivity of internal mammary arteries from hypertensive, hypercholesterolemic, and diabetic patients. **Ann Thorac Surg**. 2001; 72:1290-7.

- Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. **Circ Res**. 2002; 90:800-6.
- Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. **Acta Cardiol**. 2000; 55:221-32.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest**. 1996; 97:1916-23.
- Randall MD, Alexander SP, Bennet T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. **Biochem Biophys Res Commun**. 1996; 229:114-20.
- Ray KK, Cannon CP. Early time to benefit with intensive statin treatment: could it be the pleiotropic effects? **Am J Cardiol**. 2005; 96:54F-60F.
- Recchia AG, Filice E, Pellegrino D, Dobrina A, Cerra MC, Maggiolini M. Endothelin-1 induces connective tissue growth factor expression in cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**. 2009; 46:352-9.
- Reddy R, Chahoud G, Mehta JL. Modulation of cardiovascular remodeling with statins: fact or fiction? **Curr Vasc Pharmacol**. 2005; 3:69-79.
- Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. **Br J Pharmacol**. 1989a; 96:418-24.
- Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc Natl Acad Sci**. 1989b; 86:3375-8.
- Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk: rationale for screening and primary prevention. **Am J Cardiol**. 2003; 92:17K-22K.
- Ridker PM, Buring JE, Rifai N, Cook NR. Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score. **JAMA**. 2007; 297:611-9.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ; JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. **N Engl J Med**. 2008; 359: 2195-207.

## 178 Bibliografía

- Rikitake Y. Decreased perivascular fibrosis but not cardiac hypertrophy in ROCK1<sup>+/-</sup> haploinsufficient mice. **Circulation**. 2005; 112:2959-65.
- Rinckel LA, Faris SL, Hitt ND, Kleinberg ME. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: a novel role for rac in NADPH oxidase activation. **Biochem Biophys Res Commun**. 1999; 263:118-22
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med**. 1999a; 340:115-26.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **Am Heart J**. 1999b; 138:S419-20.
- Rowlands DB, Glover DR, Ireland MA, McLeay RA, Stallard TJ, Watson RD, Littler WA. Assessment of left-ventricular mass and its response to antihypertensive treatment. **Lancet**. 1982; 1:467-70.
- Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**. 1986; 250:1145-9.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators? **Circ Res**. 1987; 61:II61-7.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. **Am J Physiol**. 1986a; 19:H815-21.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **Am J Physiol**. 1986b; 250:822-7.
- Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H. Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. **Circulation**. 2001, 104:1767-72.
- Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblast. Critical role of the AT1 receptor subtype. **Circ Res**. 1993; 73:413-23.
- Samuelsson B, Goldyne M, Granström E, Hamberg M, Hammarström S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. **Annu Rev Biochem**. 1978; 47:997-1029.
- Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**. 2006; 24:75-84.

- Sarfstein R, Gorzalczany Y, Mizrahi A, Berdichevsky Y, Molshanski-Mor S, Weinbaum C, Hirshberg M, Dagher MC, Pick E. Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. **J Biol Chem.** 2004; 279:16007-16.
- Savoia C, Schiffrin E. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Clin Sci (Lond).** 2007; 112:375-84.
- Sawada N, Itoh H, Ueyama K, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Saito T, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Arai H, Ohno N, Komeda M, Nakao K. Inhibition of rho-associated kinase results in suppression of neointimal formation of balloon-injured arteries. **Circulation.** 2000; 101:2030-3.
- Scalia R, Gooszen ME, Jones SP, Hoffmeyer M, Rimmer DM 3rd, Trocha SD, Huang PL, Smith MB, Lefer AM, Lefer DJ. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation.** 2001; 103:2598-603.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Lancet.** 1994; 344:1383-9.
- Schini VB, Vanhoutte PM. Endothelin-1: a novel vasoactive peptide. **Pharmacol Toxicol.** 1991; 69:1-7.
- Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes. **JAMA.** 2001; 285:1711-8.
- Sedeek MH, Llinas MT, Drummond H, Fortepiani L, Abram SR, Alexander BT, Reckelhoff JF, Granger JP. Role of reactive oxygen species in endothelin-induced hypertension. **Hypertension.** 2003; 42:806-10.
- Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. **Pharmacol Ther.** 2008; 120:254-91.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men

- with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. **N Engl J Med.** 1995; 333:1301-7.
- Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, Saito I, Sasaki T, Takakura K, Nagata I, Kikuchi H, Takemae T, Hidaka H. Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. **J Neurosurg.** 1992; 76:571-7.
- Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, Hazen SL. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. **Circulation.** 2003;108:426-31.
- Sirois MG, Filep JG, Rousseau A, Fournier A, Plante GE, Sirois P. Endothelin-1 enhances vascular permeability in conscious rats: role of thromboxane A<sub>2</sub>. **Eur J Pharmacol.** 1992; 214:119-25.
- Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. **Biochem J.** 1984; 222:1-15.
- Spiteller G. Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. **Exp Gerontol.** 2001; 36:1425-57.
- Stalker TJ, Lefer AM, Scalia R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. **Br J Pharmacol.** 2001; 133:406-12.
- Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annu Rev Pharmacol.** 1997; 37:339-59.
- Sugiyama M, Ohashi M, Takase H, Sato K, Ueda R, Dohi Y. Effects of atorvastatin on inflammation and oxidative stress. **Heart Vessels.** 2005; 20:133-6.
- Suzuki H. The electrogenic Na-K pump does not contribute to endotheliumdependent hyperpolarization in the rabbit ear artery. **Eur J Pharmacol.** 1988; 156:295-7.
- Swiatkowska M, Pawlowska Z, Szemraj J, Drzewoski J, Watala C, Cierniewski CS. Cerivastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, reduces plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in endothelial cells by down-regulation of cellular signaling and the inhibition of PAI-1 promoter activity. **Jpn J Pharmacol.** 2002; 90:337-44.
- Takase H, Moreau P, Küng CF, Nava E, Lüscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. **Hypertension.** 1996; 27:25-31.

- Takemoto M, Node K, Nakagami H, Liao Y, Grimm M, Takemoto Y, Kitakaze M, Liao JK. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. **J Clin Invest.** 2001; 108:1429-37
- Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. **Circ Res.** 1999; 84:1203-11.
- The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemia Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. **N Engl J Med.** 1998; 339:1349-57.
- Tolonen H, Keil U, Ferrario M, Evans A, for the WHO MONICA Project. Prevalence, awareness and treatment of hypercholesterolaemia in 32 populations: results from the WHO MONICA Project. **Int J Epidemiol.** 2005; 34:181-92.
- Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **J Clin Invest.** 1997; 100:2793-9.
- Vagnoni KE, Christiansen ND, Holyoak GR, Janowiak MA, Martin H. Cellular source in ewes of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in uterine arteries following stimulation with lipopolysaccharide. **Biol Reprod.** 1999; 61:563-8.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes Dev.** 1997; 11:2295-322.
- Vanhoutte PM. Other endothelium-derived vasoactive factors. **Circulation.** 1993; 87:V9-17.
- Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. **J Mol Cell Cardiol.** 2002; 34:1435-42.
- Veillard NR, Mach F. Statins: the new aspirin? **Cell Mol Life Sci.** 2002; 59:1771-86.
- Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, Donado Campos JM, Rodríguez Artalejo F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. **Informe SEA.** 2007. p. 11-17.
- Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, Donado Campos JM, Rodríguez Artalejo F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA. **Ergon.** 2003. p. 43-52.

- Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. **Hypertension**. 2009; 53:1008-16.
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. **J Hypertens**. 2004; 22:535-42.
- Wallerstedt SM, Bodelsson M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. **Br J Pharmacol**. 1997; 120:25-30.
- Wang CY, Liu PY, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends Mol Med**. 2008; 14:37-44.
- Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, Rifai N, Selhub J, Robins SJ, Benjamin EJ, D'Agostino RB, Vasan RS. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. **N Engl J Med**. 2006; 355:2631-9.
- Ward NC, Croft KD, Hodgson J, Rich L, Beilin LJ, Puddey IB. Brachial artery vasomotor function is inversely associated with 24-h ambulatory blood pressure. **J Hypertens**. 2004; 22:967-72.
- Wassmann S, Laufs U, Bäumer AT, Müller K, Ahlbory K, Linz W, Itter G, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. **Hypertension**. 2001; 37:1450-7.
- Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2002; 22:300-305.
- Waters DD, Schwartz GG, Olsson AG, Zeiher A, Oliver MF, Ganz P, Ezekowitz M, Chaitman BR, Leslie SJ, Stern T. MIRACL Study Investigators. Effects of atorvastatin on stroke in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction. **Circulation** 2002; 106:1690-5.
- Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of

- beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. **J Biol Chem.** 1990; 265:22453-9.
- Wesselman JP, De Mey JG. Angiotensin and cytoskeletal proteins: role in vascular remodeling. **Curr Hypertens Rep.** 2002; 4:63-70.
- West of Scotland Coronary Prevention Study group. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Prevention Study (WOSCOPS). **Circulation.** 1998; 97:1440-5.
- Wever RM, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. **Biochem Biophys Res Commun.** 1997; 237:340-4
- Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. **Exp Cell Res.** 2004; 301:43-9.
- Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. **Hepatol.** 2002; 35:478-91.
- Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2003; 23:729-36.
- Woodward M, Rumley A, Lowe GD, Tunstall-Pedoe H. C-reactive protein: associations with haematological variables, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. **Br J Haematol.** 2003; 122:135-41.
- Yamamoto A, Hoshi K, Ichihara K. Fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation in rat liver microsomes. **Eur J Pharmacol.** 1998; 361:143-9.
- Yang ZH, Von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher TF. Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. **Circ Res.** 1991; 68:52-60.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature.** 1988; 323:411-5.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet.** 2004; 364:937-52.

## 184 Bibliografía

- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK: Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. **Hypertension**. 1998; 32:488-95.
- Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. 2000; 35:1055-61.
- Zanzinger J. Mechanisms of action of nitric oxide in the brain stem: role of oxidative stress. **Auton Neurosci**. 2002; 98:24-7.
- Zaugg CE, Hornstein PS, Zhu P, Simper D, Lüscher TF, Allegrini PR, Buser PT. Endothelin-1-induced release of thromboxane A<sub>2</sub> increases the vasoconstrictor effect of endothelin-1 in postischemic reperfused rat hearts. **Circulation**. 1996; 24:742-7.
- Zeiber AM, Goebel H, Schächinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque: a clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. **Circulation**. 1995; 91:941-7.

### **Páginas web**

[www.agemed.es](http://www.agemed.es)

[www.framinghamheartstudy.org](http://www.framinghamheartstudy.org)

[www.ine.es](http://www.ine.es)

[www.msc.es](http://www.msc.es)

[www.who.int](http://www.who.int)

[www.sanidad.jcyl.es](http://www.sanidad.jcyl.es)

## Anexo

### Sustancias utilizadas

- 1.- Agonistas.** Para los estudios de funcionalidad de vasos sanguíneos se preparan soluciones madres ( $10^{-1}$ - $10^{-2}$  M) de los agonistas utilizados que se congelan en alícuotas. Las soluciones usadas en los experimentos se preparan diariamente a partir de estas.
- 2.-** El resto de sustancias utilizadas se preparan diariamente de acuerdo a las necesidades de los experimentos y en las concentraciones mencionadas en el capítulo de metodología y resultados.

Las sustancias utilizadas aparecen a continuación:

**Ácido ortofosfórico.** Sigma-Aldrich

**Ácido tiobarbitúrico.** Sigma-Aldrich

**Ácido tricloroacético.** Merck

**Acrilamida.** Biorad

**Anticuerpo primario eNOS.** Biorad

**Anticuerpo primario COX-2.** Biorad

**Anticuerpo primario Colágeno-I.** Biorad

**Anticuerpo primario PAI-1.** Biorad

**Anticuerpo primario Fibronectina.** Biorad

**Azida sódica.** Sigma-Aldrich

**Cloruro de fenilefrina.** Sigma-Aldrich

**Cloruro de acetilcolina.** Sigma-Aldrich

**Cloruro potásico.** Merck

**9,11-dideoxi-11 $\alpha$ ,9 $\alpha$ -epoximetanoprostaglandina (U46619).** Sigma-Aldrich

**4,5-dihidroxi-1,3-benceno ácido disulfónico (Tirón).** Sigma-Aldrich

**Dinitrato de N,N'-dimetil 9,9'-biacridinio (Lucigenina).** Sigma-Aldrich

**Formaldehído en solución 4%.** Merck

**Hidrocloreuro de n (1-naftil) etilendiamina.** Sigma-Aldrich

**4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (Apocinina).** Sigma-Aldrich

**Indometacina.** Sigma-Aldrich  
**±Mevalonolactona.** Sigma-Aldrich  
**Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH).** Sigma-Aldrich  
**Nitroprusiato sódico dihidratado.** Sigma-Aldrich  
**N,N-ácido dietil-ditiocarbamato de amonio (DDC).** Sigma-Aldrich  
**Nitrito sódico.** Merck  
**N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME).** Sigma-Aldrich  
**N,N,N',N'-tetrametiletilediamina (Temed).** Sigma-Aldrich  
**Pentobarbital sódico.** Sigma-Aldrich  
**Proteína estándar SDS-PAGE.** Biorad  
**Rojo Ponceau.** Sigma-Aldrich  
**Rojo sirio.** Sigma-Aldrich  
**Sulfanilamida.** Sigma-Aldrich  
**Superóxido dismutasa.** Sigma-Aldrich  
**1,1,3,3, tetrametoxipropano (MDA).** Aldrich