



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

"Efecto de Apocinina sobre el Remodelado Vascular y la Presión Arterial en dos Modelos Ovariectomizados de Hipertensión Experimental: DOCA-sal y SHR"

Dña. María del Mar Morente Espinosa
2012

I. INTRODUCCIÓN	5
1. ESTRÉS OXIDATIVO	7
1.1. - Sistemas enzimáticos involucrados en el equilibrio redox	12
1.1.1.- Principales sistemas enzimáticos oxidantes.....	12
1.1.2.- Principales sistemas enzimáticos antioxidantes	14
1.2. El sistema NADP(H) oxidasa.....	15
1.2.1.- Activación de la NADPH oxidasa.....	19
1.2.2.- Vías de señalización	21
1.2.3.- Antioxidantes exógenos	22
2. ROS Y CONTROL VASCULAR Y CARDÍACO	24
2.1. ROS y remodelado cardíaco	24
2.2. Mecanismos moleculares de ROS a nivel vascular	25
2.3. ROS y remodelado vascular.....	28
2.3.1. Alteraciones en la túnica íntima vascular.....	28
2.3.2.- Alteraciones en la túnica media.....	35
2.3.3.- Alteraciones en la túnica adventicia	38
3. ESTRÓGENOS Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	39
3.1.- Hormonas ováricas y enfermedad cardiovascular.....	39
3.2.- Receptores de estrógenos	41
3.3. Efectos de los estrógenos a nivel vascular.....	43
3.3.1. Acción de los estrógenos en el tono vascular.....	43
3.3.2. Acción de los estrógenos en el endotelio.....	44
3.3.3.- Acción de los estrógenos sobre las células del músculo liso vascular.	53
4. ESTRÓGENOS Y REMODELADO	54
5. ESTRÓGENOS E INGESTA.....	57
5.1. Regulación de la ingesta.....	57
5.2. Estrógenos y obesidad.....	58
5.2.1. Efectos centrales de los estrógenos.	59
5.2.2. CCK y estrógenos.	59
5.2.3. Interacción del estradiol con otros péptidos.....	59
6. MODELOS ANIMALES DE HIPERTENSIÓN.....	60
6.1. Modelo SHR.....	62
6.1.1. Mecanismos fisiopatológicos en SHR.....	62
6.1.2. Hipertensión y estrés oxidativo en SHR.....	63
6.1.3. Hipertensión y remodelado vascular en SHR.	64

6.2. Modelo DOCA-sal.....	65
6.2.1. Mecanismos fisiopatológicos en DOCA-sal.....	66
6.2.2. Hipertensión y estrés oxidativo en DOCA-sal.....	67
6.2.3. Hipertensión y remodelado vascular en DOCA-sal.	67
7. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	69
II. OBJETIVOS.....	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	77
1. ANIMALES	79
2. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	79
2.1. Modelo de hipertensión DOCA sal.....	79
2.2. Modelo de hipertensión SHR	80
3. MEDIDA DE LA PAS	81
4. REMODELADO DE LOS VASOS MIOCÁRDICOS.....	81
4.1. Técnica quirúrgica	81
4.2. Técnica de inclusión en historresina.	82
4.3. Análisis de las alteraciones en la estructura de la túnica media.....	83
4.4. Alteraciones en la estructura de la túnica adventicia. Análisis morfométrico de la fibrosis.	85
5. MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR LA CUANTIFICACIÓN DE MDA (Malondialdehido) MEDIANTE TBARS.....	86
5.1. Preparación de las muestras	87
5.2. Protocolo del análisis.....	88
6. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA NADPH OXIDASA VASCULAR EN LECHO MESENTÉRICO	88
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	90
IV. RESULTADOS.....	91
1. Modelo de hipertensión DOCA	93
1.1. Comparación del peso del útero entre DOCA y DOCA-OVX.....	93
1.2. Incremento del peso corporal de DOCA y DOCA-OVX.....	93
1.3. Niveles de Malondialdehido (MDA).....	94
1.4. Presión arterial sistólica (PAS).....	96
1.5. Estructura de la pared de los vasos miocárdicos	98
1.5.1. Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con apocinina	98
1.5.2. Alteraciones en la túnica media y efectos del estradiol	102
1.5.3. Alteraciones de la túnica adventicia	104
2. Modelo de hipertensión SHR.....	106

2.1. Comparación del peso del útero entre SHR y SHR-OVX	106
2.2. Incremento del peso corporal de SHR y SHR-OVX.....	107
2.3. Actividad de la NADPH oxidasa vascular en lecho mesentérico.....	107
2.4. Presión arterial sistólica	108
2.5. Estructura de la pared de los vasos miocárdicos.....	110
2.5.1. Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con apocinina.	110
2.5.2. Alteraciones de la túnica adventicia.....	114
V. TABLAS	115
VI. DISCUSIÓN	127
1. MODELO DE HIPERTENSIÓN DOCA-SAL.....	130
1.1. Efecto de la ovariectomía en el incremento de peso corporal.....	132
1.2. Efecto de la ovariectomía sobre el aumento de la presión arterial.....	133
1.3. Efecto de la ovariectomía sobre el estrés oxidativo.....	136
1.4. Efecto de la apocinina sobre los aumentos de presión arterial en DOCA- OVX.....	137
1.5. Remodelado vascular en DOCA-OVX y efectos de la apocinina.....	138
1.6. Fibrosis perivascular en DOCA-OVX y efectos de la apocinina.....	141
2. MODELO DE HIPERTENSIÓN SHR	142
2.1. Efecto de la ovariectomía sobre la presión arterial.....	143
2.2. Aumento del estrés oxidativo en SHR y SHR-OVX	143
2.3. Remodelado vascular en SHR-OVX y efecto de la apocinina.....	145
VII. CONCLUSIONES	147
VIII. BIBLIOGRAFÍA	151

I. INTRODUCCIÓN

1. ESTRÉS OXIDATIVO

La presencia de radicales libres en los materiales biológicos fue descubierta hace menos de 60 años. Denham Harman (Harman, 1956) señaló que los radicales de oxígeno (ROS) pueden formarse como subproductos de reacciones enzimáticas en vivo. En 1956, describió a los radicales libres como una caja de Pandora de los males que pueden explicar el daño celular, mutagénesis, el cáncer y, por último pero no menos importante, el proceso degenerativo del envejecimiento biológico.

La ciencia de los radicales libres en los organismos vivos entró en una segunda etapa después de que McCord y Fridovich (McCord et al., 1969) descubrieran la enzima superóxido dismutasa y, finalmente, convencieron a la mayoría de sus colegas de que los radicales libres son importantes en biología. Se inspiró a numerosos investigadores para estudiar el daño oxidativo causado por los radicales en el ADN, proteínas, lípidos y otros componentes de la célula.

Una tercera era dio comienzo con los primeros estudios que describían los efectos biológicos favorables de los radicales libres. Mittal y Murard (Mittal et al., 1977) proporcionaron pruebas que sugieren que el anión superóxido, a través de su derivado, el radical hidroxilo, estimula la activación de la guanilato ciclasa y la formación del segundo mensajero GMPc. Efectos similares se observaron para el peróxido de hidrógeno derivado del superóxido. Ignarro y Kadowitz (Ignarro et al., 1985) y Moncada y sus colegas (Moncada et al., 1987) descubrieron el papel del óxido nítrico como una molécula reguladora en el control de la relajación del músculo liso y en la inhibición de la agregación plaquetaria. Roth y Dröge (Roth and Dröge, 1987) encontraron que en los linfocitos T activados, el anión superóxido o bajas concentraciones micromolares de peróxido de hidrógeno aumentan la producción del factor de crecimiento celular T, interleucina-2. Keyse y Tyrrell (Keyse and Tyrrell, 1989) pusieron de manifiesto que el peróxido de hidrógeno induce la expresión del gen de la hemo oxigenasa. Storz y sus colegas (Storz et al., 1990) informaron de la inducción de varios genes en las bacterias por el peróxido de hidrógeno, y Schreck y Baeuerle (Schreck et al., 1991) confirmaron la activación del factor de transcripción nuclear kB por el peróxido de hidrógeno en células de mamíferos.

Desde principios del siglo XXI hay una gran cantidad de pruebas que demuestran que los organismos vivos no sólo se han adaptado a una convivencia hostil con los radicales libres, sino que han desarrollado mecanismos para la utilización ventajosa de estos.

Se define estrés oxidativo como el estado de desequilibrio redox en el cuál los pro-oxidantes vencen a la capacidad antioxidante, dando lugar a un incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS se producen como intermedios en reacciones de oxidación-reducción (redox) que van desde el O_2 al H_2O . Las ROS influyen, como ya hemos comentado, en muchos procesos fisiológicos incluyendo los procesos de defensa, la biosíntesis de hormonas, la fertilización, y la señalización celular. El aumento de la producción de ROS, llamado estrés oxidativo, está implicado en varias patologías, incluyendo la hipertensión, arterioesclerosis, diabetes, y en la enfermedad renal crónica (Touyz et al., 2004).

La familia de las ROS consta de muchas moléculas que tienen efectos divergentes sobre la función celular, tales como la regulación del crecimiento, diferenciación y muerte celular, control de la producción y descomposición de la matriz extracelular, inactivación del óxido nítrico y estimulación de muchas quinasas y genes proinflamatorios. Es importante destacar que muchas de estas acciones están asociadas a cambios patológicos observados en la enfermedad cardiovascular.

Como especies reactivas del oxígeno se incluyen a dos grandes grupos (Figura I.1):

- Los radicales libres del oxígeno (RLO) como el anión superóxido ($\cdot O_2^-$) el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el óxido nítrico (NO^\cdot).
- Otros compuestos de oxígeno que, si bien no pueden catalogarse químicamente como radicales libres, sí que son altamente pro-oxidantes y capaces de generar radicales libres durante su metabolismo como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Por tanto, “definimos radical libre como cualquier especie con existencia independiente que contiene uno o más electrones desapareados”. Los derivados

no radicales son menos reactivos y más estables, con una vida media más larga que los radicales libres (Dröge, 2002).

La reducción secuencial del oxígeno es la siguiente:

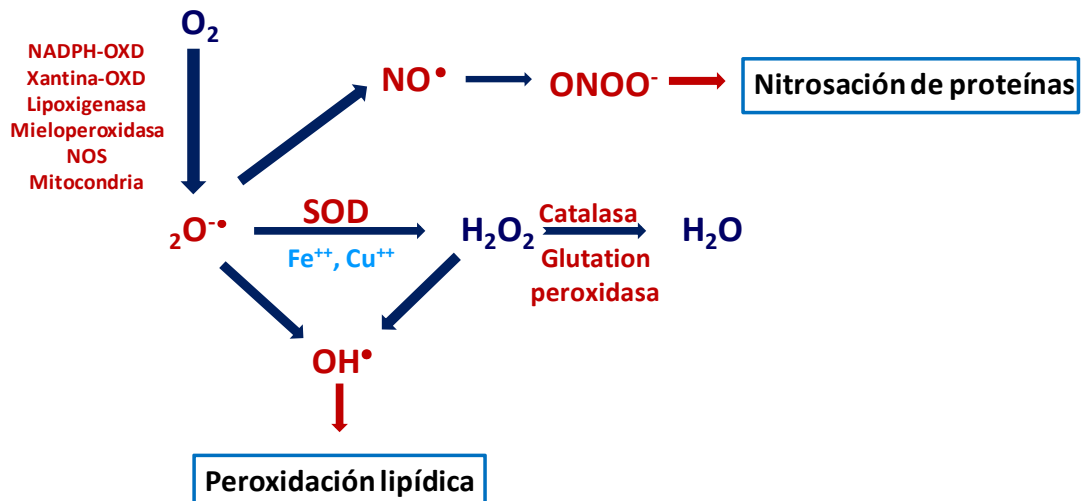


Figura I.1.- Esquema de la generación y metabolismo de los principales radicales libres de oxígeno.

El término señalización redox es ampliamente usado para describir un proceso regulatorio en el cual la señal es realizada a través de la química redox. Esta señalización redox es utilizada por una amplia gama de organismos, incluyendo las bacterias, para inducir respuestas protectoras contra el daño oxidativo y para restablecer el estado original de equilibrio redox después de la exposición temporal a ROS.

Los radicales libres y las especies reactivas no radicales derivadas de estos existen en células y tejidos a bajas concentraciones, pero medibles (Halliwell et al., 1989; Sies, 1993). Sus concentraciones están determinadas por el balance entre sus tasas de producción y sus tasas de eliminación por diferentes compuestos antioxidantes y enzimas. Halliwell y Gutteridge (Halliwell et al., 1989) han definido a los antioxidantes como sustancias que son capaces, a concentraciones relativamente bajas, de competir con otros sustratos oxidables y, por tanto, retrasar considerablemente o impedir la oxidación de estos sustratos. Esta definición incluye a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y catalasa,

así como componentes no enzimáticos como α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato (vitamina C) y glutatión.

Además, existen compuestos que tienen una actividad antioxidante específica relativamente baja, pero que, cuando están presentes a altas concentraciones, pueden contribuir significativamente a la actividad de captación de ROS. Los ejemplos más importantes son los aminoácidos libres, péptidos y proteínas (Stadtman, 1993).

Las células vivas y los tejidos tienen varios mecanismos para restablecer el estado redox original después de una exposición temporal a concentraciones de ROS aumentadas. Concentraciones elevadas de ROS inducen en muchas células la expresión de genes cuyos productos poseen actividad antioxidante. Un mecanismo importante en la homeostasis redox está basado en cascadas sensibles a redox inducidas mediante ROS que conducen a la expresión aumentada de enzimas antioxidantes o a un aumento en el sistema de transporte de cisteína, que, a su vez, facilita en ciertos tipos de células el aumento de la concentración intracelular de glutatión.

Las células o tejidos se encuentran en un estado estable si las tasas de producción de ROS y de destrucción son constantes y están en equilibrio. La señalización redox requiere que este equilibrio se altere, ya sea por un aumento en las concentraciones de ROS o una disminución en la actividad de uno o más sistemas antioxidantes. Sin embargo, respuestas similares pueden ser inducidas por condiciones de estrés oxidativo generadas por factores ambientales. Si el aumento inicial de ROS es relativamente pequeño, la respuesta antioxidante puede ser suficiente para compensar el aumento de ROS y para restablecer el equilibrio original entre la capacidad de producción y de destrucción de ROS. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, la producción de ROS se incrementa con más fuerza y persistencia, y la respuesta antioxidante puede no ser suficiente para restablecer en el sistema el equilibrio redox original. En tales casos el sistema aún puede llegar a un equilibrio pero el estado resultante puede ahora estar asociado con altas concentraciones de ROS y diferentes niveles de aminoácidos libres y/o diferentes patrones de expresión génica debidos a las rutas de señalización sensibles a redox (Dröge, 2001).

Las ROS juegan un importante papel en la patogénesis de muchas patologías. Además los radicales libres han sido implicados en el mecanismo de envejecimiento. Los organismos pluricelulares generalmente pasan por cambios cualitativos en el tiempo que están asociados con la degeneración progresiva de las funciones biológicas, aumento de la susceptibilidad a las enfermedades, y el aumento de probabilidad de muerte dentro de un período de tiempo determinado. La teoría de los radicales libres en el envejecimiento establece que el proceso degenerativo relacionado con la edad es en gran medida la consecuencia del daño producido por los radicales libres. La evidencia genética que une el estrés oxidativo con el envejecimiento ha sido obtenida de diferentes especies animales (Harman, 1956).

Además hay una conciencia creciente de que el estrés oxidativo juega un papel importante en diversas situaciones clínicas. Estas enfermedades se dividen en dos categorías principales. En la primera, la diabetes mellitus y el cáncer muestran habitualmente un cambio pro-oxidativo sistémico en el estado redox tiol / disulfuro y la eliminación alterada de la glucosa, lo que sugiere que las mitocondrias del músculo esquelético pueden ser el principal sitio de producción elevada de ROS.

La segunda categoría se conoce como “condiciones inflamatorias oxidativas”, ya que están típicamente asociadas con una estimulación excesiva de la actividad NADPH oxidasa por citoquinas u otros agentes. En este caso, el aumento de los niveles de ROS o los cambios en los niveles de glutatión intracelular están a menudo asociados con cambios patológicos indicativos de una desregulación de las cascadas de señalización y/o la expresión de genes, que se manifiestan en alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión celular (Pantel et al., 1995; Thiery et al., 1996; Dosquet et al., 1992).

En el caso de la diabetes mellitus, el estrés oxidativo está asociado a un cambio pro-oxidativo del estado redox del glutatión en la sangre (De Mattia et al., 1998). Los niveles elevados de glucosa están asociados con una producción aumentada de ROS por diversos mecanismos. El tratamiento con antioxidantes atenúa las complicaciones de la diabetes como la disfunción de las células endoteliales y el aumento de la agregación plaquetaria (Ceriello et al., 1991).

En la arteriosclerosis las áreas vasculares afectadas contienen células mononucleares, proliferación de células musculares lisas, y componentes de la matriz extracelular. La arteriosclerosis es comúnmente vista como una enfermedad inflamatoria crónica que se asocia con ciertos factores de riesgo como la hiperlipidemia, la diabetes y la hipertensión. El estrés oxidativo media e induce la expresión de proteínas quinasas como la quinasa de adhesión focal y las moléculas de adhesión intercelular como la ICAM-1 que son fundamentales para el comienzo de la enfermedad vascular (Alexander, 1995).

1.1. - Sistemas enzimáticos involucrados en el equilibrio redox (Figura I.1)

La familia de las ROS incluye moléculas altamente bioactivas y de corta vida que derivan de la reducción del oxígeno molecular. Múltiples sistemas enzimáticos utilizan diferentes sustratos como fuente de electrones para producir una amplia variedad de ROS como el superóxido, el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, ácido hipocloroso y radicales lipídicos. Varios sistemas enzimáticos contribuyen a la producción y a la degradación de ROS. Bajo condiciones fisiológicas la formación y eliminación de ROS está delicadamente equilibrada. Sin embargo, el aumento de la actividad de enzimas oxidantes y/o la reducida actividad de enzimas antioxidantes da lugar a estrés oxidativo.

1.1.1.- Principales sistemas enzimáticos oxidantes

- La cadena respiratoria mitocondrial

Es el mecanismo de producción de oxidantes a nivel intracelular. En condiciones normales el flujo de electrones en la mitocondria es utilizado en un 97% para reducir el oxígeno a agua. El 3% restante forma $\cdot O_2^-$ que es rápidamente transformado en H_2O_2 por la superóxido dismutasa. En condiciones de hipoxia y sobre todo en la fase de reperfusión se produce una masiva generación de ROS debido al oxígeno que llega a la mitocondria.

- Xantina oxidasa (XO)

Xantina oxidasa y xantina dehidrogenasa son isoformas del mismo enzima, la xantina-oxidoreductasa. Ambas catalizan la conversión de hipoxantina en

xantina y ésta en ácido úrico, durante el metabolismo de las purinas. El enzima existe en la forma dehidrogenada, pero en determinadas ocasiones como la hipoxia predomina la forma oxidada y después de la reperfusión esta produce una elevada generación de ROS. La expresión de xantina oxidada está estimulada por NADPH oxidada, lo que pone de manifiesto la estrecha relación entre ambas.

Esta enzima reduce el oxígeno molecular dando lugar a la formación de superóxido y de peróxido de hidrógeno y es capaz de producir grandes cantidades de ROS bajo condiciones patológicas. Se expresa en células vasculares y también circula en el plasma y se une a las células endoteliales de la matriz extracelular.

- Lipoxigenasa (LO)

Las lipoxigenasas son enzimas que contienen hierro y catalizan la incorporación de oxígeno molecular a ácidos grasos poliinsaturados. Algunas isoformas de lipoxigenasas han sido implicadas en la aterosclerosis a través de la generación de ROS y de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (oxi-LDL). Por otro lado, las LO son enzimas clave para la síntesis de leucotrienos que tan importantes son en la inflamación ya que se generan ROS durante su síntesis. La 5-LO se encuentra en las placas de ateroma y está implicada en otras afecciones cardiovasculares en el ser humano.

- Óxido nítrico sintasas (NOS)

Las NOS son una familia enzimática que cataliza la conversión de L-arginina en L-citrulina con la producción de óxido nítrico (NO). Existen tres isoformas: la neuronal nNOS, la endotelial eNOS y la inducible iNOS, según el tejido donde fueron descritas por primera vez. La transferencia de electrones para oxidar la L-arginina para formar NO precisa de cofactores, principalmente la tetrahidrobiopterina (BH4). Cuando falta este cofactor se dice que la NOS está "desacoplada" y en vez de transferir los electrones a L-arginina genera $\cdot\text{O}_2^-$ incrementando la producción de ROS. Por otro lado no hay que olvidar que NO puede reaccionar con otros ROS; así, NO reacciona con el superóxido para formar peroxinitrito.

- Mieloperoxidasa

Es una hemoproteína que se expresa en neutrófilos y monocitos, la cuál es secretada durante la activación de estas células. La mieloperoxidasa utiliza el

peróxido de hidrógeno para producir ácido hipocloroso. Esta enzima también ejerce una actividad peroxidasa clásica y oxida una amplia variedad de sustratos orgánicos a intermediarios reactivos del oxígeno.

- NAD(P)H oxidasa

Es una de las principales fuentes de ROS en las células vasculares. La regulación de los niveles de expresión y translocación de diferentes subunidades de la NADPH oxidasa da lugar a cambios en la actividad de todo el sistema enzimático. Por su importancia en las células vasculares le dedicaré más adelante una sección completa.

Además de los sistemas enzimáticos descritos hay otras fuentes de producción de ROS en células vasculares incluyendo la cadena de transporte mitocondrial, el citocromo P450, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, hemo oxigenasa y glucosa oxidasa.

1.1.2.- Principales sistemas enzimáticos antioxidantes(Figura I.1).

-Superóxido dismutasas

Las superóxido dismutasas (SOD) son el mayor sistema de defensa celular contra el superóxido en las células vasculares. Estas enzimas contienen metales redox en el centro catalítico y dismutan los radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Se han identificado tres isoformas de las SOD: la SOD mitocondrial que contiene manganeso (Mn-SOD, SOD-2), la SOD citosòlica que contiene cobre/zinc (CuZnSOD, SOD-1) y la SOD extracelular (eSOD, SOD-3), la cual es una enzima que también contiene cobre y zinc que es principalmente producida por las células musculares lisas vasculares y se une a los glicosaminoglucanos de la matriz extracelular vascular en la superficie de las células endoteliales. La eSOD juega un importante papel en la regulación del estado oxidante en el intersticio vascular.

- Glutation peroxidasa

El glutatión reducido juega un importante papel en la regulación del estado redox intracelular de las células vasculares, proporcionando equivalentes de reducción para muchas rutas bioquímicas. La glutatión peroxidasa (GPX) es una

enzima antioxidante que contiene selenio que reduce el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos a agua y alcoholes lipídicos, respectivamente, y a su vez oxida el glutatión a glutatión disulfuro. A falta de una adecuada actividad GPX o de los niveles de glutatión, el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos no son eliminados y pueden convertirse a radicales hidroxilo y radicales peroxilo lipídicos, respectivamente. El sistema GPX se cree que es la mejor defensa en el caso de bajo nivel de estrés oxidativo.

- Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante intracelular que está principalmente localizada en los peroxisomas celulares y hasta cierto punto en el citosol, que cataliza la reacción de transformación del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular. Al eliminar el peróxido de hidrógeno, de forma indirecta elimina los radicales superóxido, que se convierten en peróxido de hidrógeno por la SOD. Esta enzima también tiene actividad peroxidasa y reacciona con peróxidos orgánicos y donadores de hidrógeno a agua y alcoholes orgánicos. La catalasa es muy efectiva en situaciones de alto nivel de estrés oxidativo y protege a las células del peróxido de hidrógeno producido dentro de ellas. Esta enzima es especialmente importante en el caso de un contenido de glutatión limitado o una actividad GPX reducida y juega un papel significativo en el desarrollo de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células.

- Tioredoxin reductasa

Esta es una enzima antioxidante que participa en los procesos reductivos celulares tior dependientes. La enzima regenera tioredoxina reducida, que sirve como equivalente reductor, y también puede reducir directamente los hidroperóxidos lipídicos. El sistema tioredoxin puede regenerar proteínas que fueron inactivadas por estrés oxidativo (Wassmann et al. 2004).

1.2. El sistema NADP(H) oxidasa

Estudios experimentales y clínicos han propuesto que la NADPH oxidasa es la enzima predominante en la producción de $\cdot O_2^-$ en el contexto del estrés oxidativo en la enfermedad cardiovascular.

La NADPH oxidasa es una multisubunidad enzimática que cataliza la producción de O_2^- a través de la siguiente reacción:



Aunque la NADPH oxidasa se consideró inicialmente como una enzima que se expresaba únicamente en células fagocíticas implicadas en la defensa e inmunidad, diferentes pruebas indican que hay toda una familia de NADPH oxidasas las cuales se expresan en muchos tejidos y median diversas funciones biológicas. La familia comprende 7 miembros: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5 y Duox1 y Duox2. (Paravicini et al. 2008). Cada isoforma está codificada por genes separados y con distinta distribución en los tejidos. (Sirker et al, 2007).

Nox 1: Se encuentra en el colon y células vasculares. Juega un importante papel en la defensa y en el crecimiento celular.

Nox 2: Se expresa en fagocitos y células vasculares, cardíacas, renales y nerviosas.

Nox 3: Se encuentra en el tejido fetal y en el adulto en el oído interno.

Nox 4: Aparece en riñón, células vasculares y osteoclastos.

Nox 5: Es Ca^{++} dependiente y está presente en testículos, tejido linfoide y células vasculares. No aparece en ratas y ratones.

Duox1 y 2: Están envueltas en la síntesis de hormonas tiroideas. (Paravicini et al, 2008).

Cada isoforma de la NADPH oxidasa contiene una subunidad Nox catalítica, las cuáles facilitan la transferencia de electrones, y una subunidad más pequeña p22phox. Algunas de las isoformas, como Nox1 y Nox2, también requieren subunidades adicionales de proteínas para la activación de la enzima. (Sirker et al, 2007).

La NADPH oxidasa prototipo y mejor caracterizada es la que se encuentra en los fagocitos (Babior et al. 2002). Esta NADPH oxidasa comprende al menos cinco componentes: p47phox, p67phox, p40phox, p22phox, y gp91phox (también conocida como Nox2) (Figura I.2). (Vignais 2002.). Como componentes adicionales aparecen las pequeñas proteínas G Rac2 (Rac1 en algunas células) y Rap 1A. En células sin estimular p40phox, p47phox y p67phox existen en el citosol, mientras

que p22phox y gp21phox se encuentran en las membranas como una flavoproteína heterodimérica, el citocromo b558. Bajo estimulación celular, p47phox se fosforila, las subunidades citosólicas forman un complejo que luego migra hacia la membrana donde se asocia con el citocromo b558 para formar la oxidasa activa, la cual transfiere los electrones desde el sustrato al O_2 dando lugar a la generación de $\cdot O_2^-$. (Leusen et al. 1996). Mientras que la fosforilación de p47phox y p67phox está sumamente involucrada en la activación de la NADPH oxidasa, la subunidad p40phox fosforilada no es esencial para la activación y parece tener un efecto regulador negativo de la oxidasa. (Lopes et al. 2004).

Característica	NADPH oxidasa fagocítica	NADPH oxidasa vascular
Actividad en estado basal	Inactiva	Activa constitutivamente
Inducible por:	Citoquinas, patógenos	Agentes vasoactivos, factores de crecimiento, factores físicos
Homólogos de Nox	Nox2	Nox1/Nox2/Nox4/Nox5
Producción de $\cdot O_2^-$	Inmediata	Baja y sostenida
Concentración de $\cdot O_2^-$	Alta	Baja
Sitio de generación del $\cdot O_2^-$	Extracelular	Intracelular

Tabla I.1. Características de la NADPH oxidasa fagocítica y vascular.

La NADPH oxidasa es la primera fuente de $\cdot O_2^-$ en la vasculatura (Figura I.2) y es funcionalmente activa en todas las capas de la pared vascular: en el endotelio, la capa media, la adventicia y en CMLVs cultivadas, fibroblastos y células endoteliales (Touyz et al. 2002). A diferencia de la NADPH oxidasa fagocítica (Tabla I.1) que solamente es activada bajo estimulación, la oxidasa vascular está constitutivamente activa y produce $\cdot O_2^-$ de manera lenta y sostenida y actúa como molécula de señalización intracelular. (Lassegue et al. 2003).

Todas las subunidades de la NADPH oxidasa fagocítica se expresan, en diversos grados, en las células vasculares. En las células endoteliales y adventicias están presentes p47phox, p67phox, p22phox y gp21phox (Rey et al, 2002; Lassegue et al., 2003; Touyz et al., 2003). La situación es más compleja en células musculares

lisas vasculares (CMLVs), donde las subunidades principales no siempre se detectan, y solamente p47phox y p22phox parecen expresarse constantemente. (Lassegue et al., 2003).

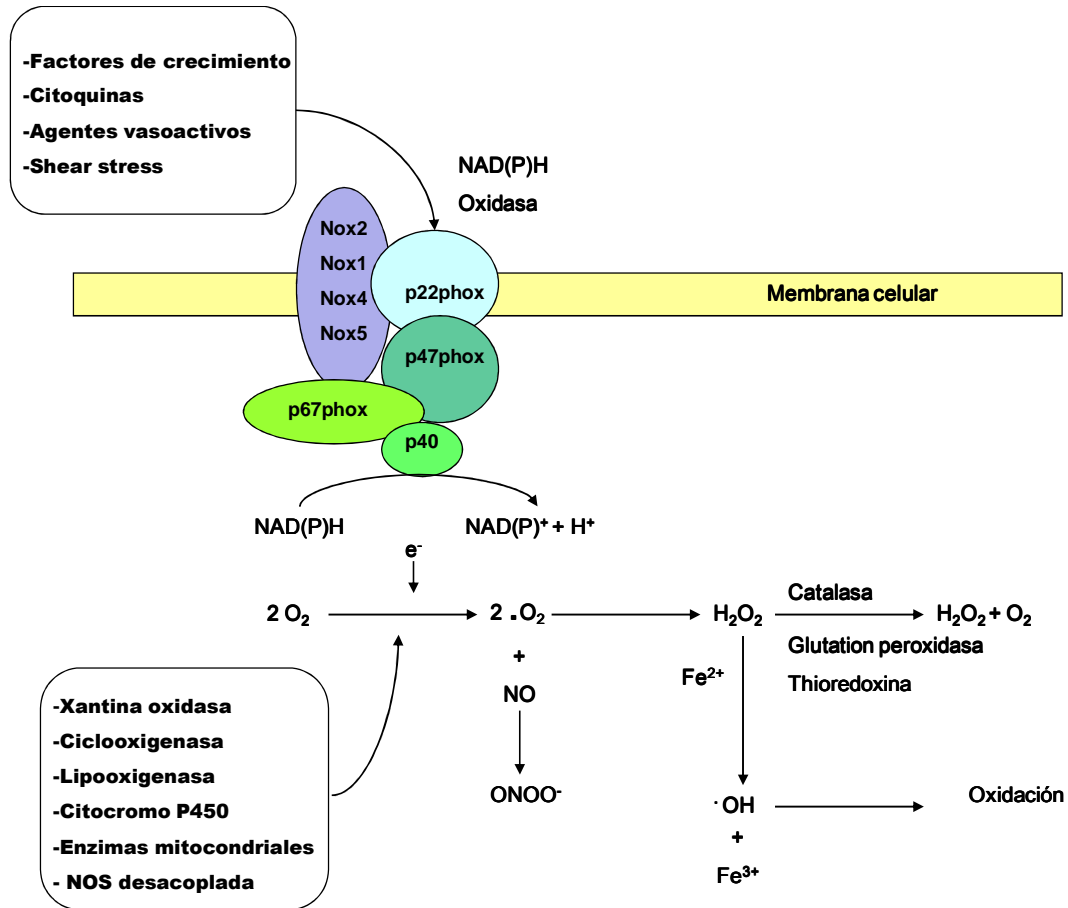


Figura I.2.- Generación de superóxido y peróxido de hidrógeno en células vasculares mediada por la activación de la NADPH-oxidasa (Modificado de Touyz et al., 2004).

Por lo tanto la estructura enzimática de la NADPH oxidasa vascular también presenta variaciones con respecto a la fagocítica (Figura I.2). En general, las subunidades son las mismas en ambos sistemas, pero la distribución es diferente según el tipo celular de los componentes de la vasculatura, incluso hay subunidades que no se ha podido constatar su existencia en determinados tipos celulares (Lassegue et al., 2003). En las células endoteliales (CEs) se ha demostrado, tanto a nivel de ARNm como de proteína, la presencia de p22phx, gp21phox y p47phox. Se han identificado varios componentes de esta oxidasa que, aunque se parece, es distinta de la oxidasa fagocítica, que incluyen la p22phox, la p47phox, y de la endotelial, cuya subunidad gp21phox se denomina Nox1 porque no es del todo igual. El componente específico de las CMLVs se llama Mox1 y equivale a

gp21phox (Patterson et al., 1999). En los últimos años se han ido descubriendo diversos homólogos de la subunidad gp21phox, también llamada Nox2 y sus isoformas funcionales Nox1, Nox3, Nox4 y Nox5 (Bokoch et al., 2003). Asimismo, se han descrito también diversas isoformas de las subunidades p47phox y p67phox en humanos (Geiszt et al., 2003).

Es debido a estas diferencias en su actividad y estructura, y a su expresión en un gran número de tipos celulares, que se postula que la NADPH oxidasa es en realidad una familia de enzimas muy compleja y constituida por diversos miembros (Cai et al., 2003).

1.2.1.- Activación de la NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa vascular es una enzima constitutiva cuyo nivel de activación puede considerarse regulado por hormonas, cambios metabólicos locales y cambios hemodinámicos. La activación de la enzima en células vasculares parece acontecer en dos fases: a corto plazo se activan sistemas de fosforilación que incrementan la actividad oxidasa de los complejos ya existentes y a largo plazo se activan los sistemas que desembocan en la síntesis de las subunidades (Romero et al., 1999).

La NADPH oxidasa vascular es sensible a: 1) Agonistas de los receptores acoplados a proteínas G como angiotensina II, endotelina-1, serotonina, trombina, bradiquinina y agonistas α -adrenérgicos; 2) factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento transformante β ; 3) citoquinas como el factor de necrosis tumoral α , interleucina-1 y el factor de agregación plaquetaria; 4) fuerzas mecánicas como el estiramiento cíclico o el aumento de las fuerzas de rozamiento; 5) isquemia-reperfusión; y 6) factores metabólicos como hiperglucemia, hiperinsulinemia, ácidos grasos libres, etc. (Sirker et al., 2007; Paravicini et al., 2008).

Factores Humorales	Tipo Celular
Ang II	CE, CMLV, fibroblastos, fagocitos
ET-1	CE, fagocitos
PDGF	CMLV
Glucosa	CMLV, CE
IL-1	CE, fibroblastos
IL-1 β	CMLV
IL-15	Monocitos
IF- γ	CE, macrófagos
Lactato	Cardiomiocito
Lactosilceramida	CE
LDL oxidada	CE
Lipopolisacárido	Neutrófilos
Factor activador de plaquetas	Fibroblastos
Isquemia-reperfusión	Cardiomiocitos
TNF- α	CMLV, fibroblastos, neutrófilos, monocitos
Trombina	CMLV
HEMODINÁMICOS	
Estiramiento cíclico	CMLV
Fuerzas de rozamiento	CE
Tensión cíclica	CE

Tabla I.2.- Factores que activan la enzima NADPH oxidasa vascular.

La trombina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, TNF- α , lactosilceramida y angiotensina II entre otros estimulan la NADPH oxidasa en CMLVs. Con respecto a los cambios metabólicos, isquemia-reperfusión y el lactato estimulan la actividad oxidasa en cardiomiocitos. Los fibroblastos muestran incremento en la actividad oxidasa en respuesta a TNF- α , interleucina-1 y al factor de activación plaquetaria. En CEs los cambios hemodinámicos como el estrés de estiramiento oscilatorio y la tensión cíclica estimulan la actividad NADPH oxidasa (Tabla I.2).

La regulación de la actividad oxidasa en las células vasculares ocurre al menos a dos niveles. Primero, la activación de la oxidasa puede estar mediada por mensajeros secundarios intracelulares, incluyendo el calcio. Aunque la actividad oxidasa en los neutrófilos está regulada por proteína quinasa C (PKC), no está claro si esta quinasa participa en la activación de las oxidasas no fagocíticas. Estudios con activadores de la proteína quinasa C (PKC) no dieron resultado en la producción de $\cdot\text{O}_2^-$, pero aumentó la actividad NADPH oxidasa en CMLVs. Las vías de fosforilación, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, parecen estar mediadas por la PKC en CEs y fibroblastos. En CMLV, en lugar de la PKC, parece ser que el mecanismo de mayor importancia es el del ácido araquidónico mediado por lipooxigenasa. En segundo lugar, la actividad oxidasa puede ser también regulada por la regulación creciente de los componentes de los mRNAs. Por ejemplo, el TNF- α aumenta la actividad NADPH oxidasa en CMLVs y este evento es dependiente de una transcripción aumentada de p22phox y la angiotensina II aumenta la expresión de P67phox en fibroblastos (Griendling et al., 2000).

1.2.2.- Vías de señalización

Las formas en las que las ROS ejercen sus efectos celulares (Figura I.3) incluyen: 1) alteración de la actividad de proteínas quinasas sensibles a redox, como la activación de las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y proteínas quinasas B, C y D, la de las tirosin quinasas y las de las AKT quinasas; 2) alteración de la actividad de los factores de transcripción como el NF- $\kappa\beta$, proteína activadora 1 y STATs; y 3) efectos directos sobre enzimas como las MMPs, receptores o canales iónicos (Sirker et al., 2007).

Debido al elevado número de hormonas y factores de crecimiento que modifican las concentraciones intracelulares de ROS y a las variadas vías de señalización implicadas, no sorprende que sean numerosos los genes sensibles al estado redox. En general, estos procesos desembocan en la activación de una serie de factores de transcripción que regulan, entre otros, moléculas de adhesión como MCP-1 (Brandes R. P. et al., 2001), ICAM (Arai et al., 1998) y VCAM-1 (Gollins et al., 2001), citoquinas como TGF- β e IL-6 (Allen et al., 2000), sustancias vasoactivas y enzimas antioxidantes.

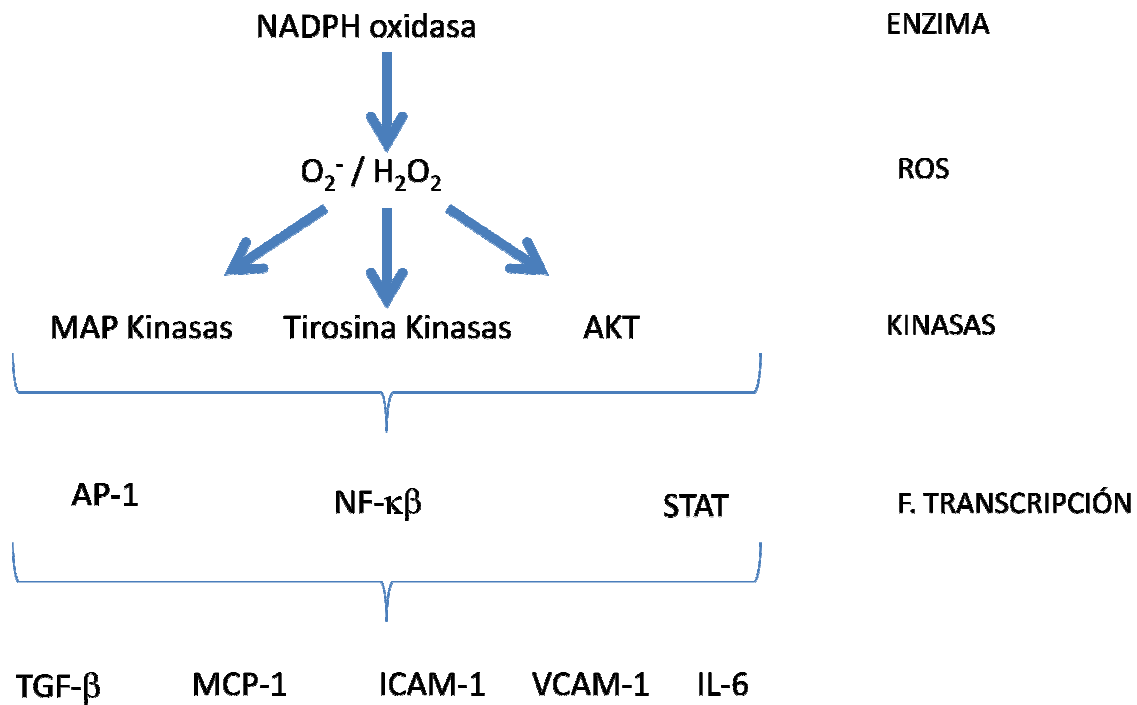


Figura I.3.- Vías de señalización a partir de la actividad de la NADPH oxidasa vascular.

1.2.3.- Antioxidantes exógenos

Conocidos los efectos negativos de los ROS sobre el organismo y su posible participación en muchas enfermedades, resulta fácil entender que se tratara de evitar sus deletéreos efectos con tratamientos antioxidantes. Esto ha sido especialmente aplicado en el caso de la enfermedad cardiovascular. Tres sustancias han sido utilizadas: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (alfa-tocoferol) y el β -caroteno (provitamina A), aunque como vamos a comentar, con distintos resultados. Hay que distinguir dos tipos de estudios: los de prevención primaria y los de prevención secundaria. En los de prevención primaria se ha intentado prevenir una recidiva en los pacientes que habían sufrido un cuadro patológico, para ello se les ha administrado uno de los antioxidantes citados y los resultados han demostrado que no ha mejorado la incidencia de la enfermedad. En la prevención secundaria se trata de evitar las manifestaciones de una enfermedad cardiovascular cuando ya se ha producido, es decir se administran los antioxidantes como terapia intentando mejorar los síntomas y las consecuencias de la enfermedad. Aunque se ha obtenido algún efecto esperanzador, los resultados en

su conjunto parecen indicar que tampoco el tratamiento con vitamina C, E o β -caroteno mejora la prevención secundaria (Sugamura et al. 2011).

En nuestro trabajo hemos elegido como antioxidante, para el tratamiento y estudio de sus efectos, la Apocinina ya que específicamente bloquea la actividad de la NADPH-oxidasa; dado que como hemos señalado anteriormente, la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno en los vasos es la NADPH oxidasa, un enzima asociado a la membrana que cataliza la reducción del oxígeno usando como dador de electrones a la NADPH.

La apocinina es la 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona (Figura I.4) y fue por primera vez descrita por el farmacólogo alemán O. Schmiedeberg en 1883 y extraída de las raíces del cáñamo canadiense (*Apocynum cannabinum*). Ya entonces se conocían sus propiedades para el tratamiento de las enfermedades hepáticas y cardíacas. Posteriormente, la apocinina fue aislada de la *Picrorhiza kurroa* una pequeña planta que crece en las alturas del Himalaya y que era usada por los monjes budistas como antiinflamatorio.

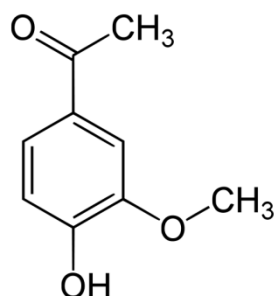


Figura I.4.- Estructura química de la apocinina

Recordando lo que anteriormente hemos expuesto en relación a la estructura y función de la NADPH-oxidasa, el mecanismo de acción de la Apocinina ya se conoce: evita la translocación de las subunidades de p47phox y p67phox desde el citoplasma a la membrana e impide el ensamblaje de la NADPH oxidasa, de esta forma es efectiva en eliminar el aumento en la producción de ROS (Stolk et al., 1994)

En 2002 se demostró (Hamilton et al. 2002) que en anillos de arterias de rata y humanas la Apocinina disminuía la producción de superóxido, aumentaba la

generación de NO y mejoraba la función endotelial. Se ha demostrado también que el tratamiento con Apocinina disminuye la presión arterial en ratas hipertensas disminuyendo los niveles de superóxido, sin aumentar la producción de NO.

2. ROS Y CONTROL VASCULAR Y CARDÍACO

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en la fisiopatología de la enfermedad vascular. Especies reactivas del oxígeno, especialmente el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, son importantes moléculas de señalización en las células cardiovasculares. Estas especies reactivas del oxígeno participan en el crecimiento, apoptosis y migración de las células del tejido muscular liso vascular, en la modulación de la función endotelial y contribuyen a la elevación de la presión arterial al influir en la estructura y función vascular.

2.1. ROS y remodelado cardíaco

Sin embargo, antes de comentar los datos existentes de los efectos de los ROS sobre el sistema vascular, vamos a presentar las acciones de estos sobre el corazón. Es bien sabida la elevada morbilidad y mortalidad que suponen las patologías relacionadas con el miocardio, especialmente los problemas derivados del fenómeno de la isquemia-reperfusión y la insuficiencia cardíaca. El infarto de miocardio supone una interrupción del flujo coronario y actualmente las terapias incluyen la angioplastia y la trombolisis. Se sabe que la restauración del flujo sanguíneo activa a las células inflamatorias y produce una respuesta de lesión celular, efectos que conocemos como injuria por reperfusión. Esta trae como consecuencia un mayor daño en los cardiomiocitos, disminución de la función contráctil acompañado de arritmias. Hoy se sabe que muchas de estas consecuencias son producidas porque la isquemia-reperfusión produce una elevada generación de ROS que puede durar varias horas después de la desaparición del trombo (Sugamura et al., 2011). El aumento de ROS a nivel cardíaco puede participar en varias patologías cardíacas como resumimos en la Figura I.5.

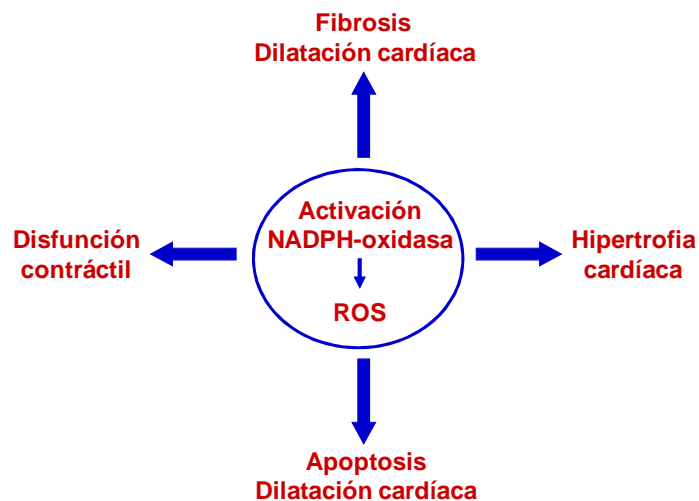
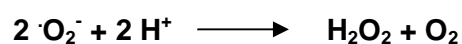


Figura I.5.- Efecto de la activación de NADPH-oxidasa sobre el remodelado cardíaco (Modificado de Nabeebaccus et al. 2011)

2.2. Mecanismos moleculares de ROS a nivel vascular

Tradicionalmente, se ha considerado a los macrófagos como la mayor fuente de ROS en la pared vascular y no hay duda de que estas células juegan un importante papel en la patología vascular. Sin embargo, prácticamente todas las células de la pared vascular producen ROS, en diversas cantidades y en respuesta a diferentes estímulos, los cuales pueden actuar de manera autocrina o paracrina para modular la función celular. Estas ROS son producidas por todo tipo de células vasculares, incluyendo el endotelio, músculo liso y células adventicias y pueden ser formadas por numerosas enzimas.

De las ROS generadas en las células cardiovasculares, el $\cdot\text{O}_2^-$ y el H_2O_2 parecen tener una particular importancia. En sistemas biológicos el $\cdot\text{O}_2^-$ tiene una vida muy corta reduciéndose rápidamente a H_2O_2 por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 tiene una vida media más larga, es relativamente estable y es fácilmente difusible dentro y fuera de la célula. La ROS vascular mayoritaria es el anión superóxido el cuál inactiva al óxido nítrico (NO) que es el principal factor de relajación vascular produciendo ONOO^- . La mayor fuente de H_2O_2 en el tejido vascular es esta dismutación del O_2^- siguiendo la siguiente reacción:



Esta reacción puede ocurrir de manera espontánea o estar catalizada por la SOD. El H_2O_2 puede convertirse, posteriormente, en agua por la catalasa y la glutatión-peroxidasa. Las diferentes propiedades del $\cdot\text{O}_2^-$ y del H_2O_2 y sus diferentes sitios de distribución indican que las ROS pueden activar distintas vías de señalización que conducen a respuestas funcionales potencialmente divergentes y opuestas. Por ejemplo, un aumento de los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ inactivan al vasodilatador NO dando lugar a disfunción endotelial y vasoconstricción, característicos de muchas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la hipertensión. Por otro lado, el H_2O_2 actúa como un vasodilatador en muchos lechos vasculares, incluyendo las arterias cerebrales, coronarias y mesentéricas. (Paravicini et. al., 2008).

Altos niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ y la consecuente acumulación de H_2O_2 y la disminución de la biodisponibilidad de NO juegan un papel crítico en la modulación del remodelado vascular. El producto de la reacción entre O_2^- y NO constituye una importante molécula oxidante, la cuál es capaz de oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, causando daño celular (Fortuño et. al., 2005). Estos procesos patológicos están asociados con la hipertensión porque contribuyen al estrechamiento de la luz arterial y consecuentemente a un incremento de la resistencia periférica y la presión sanguínea (Figura I.6).

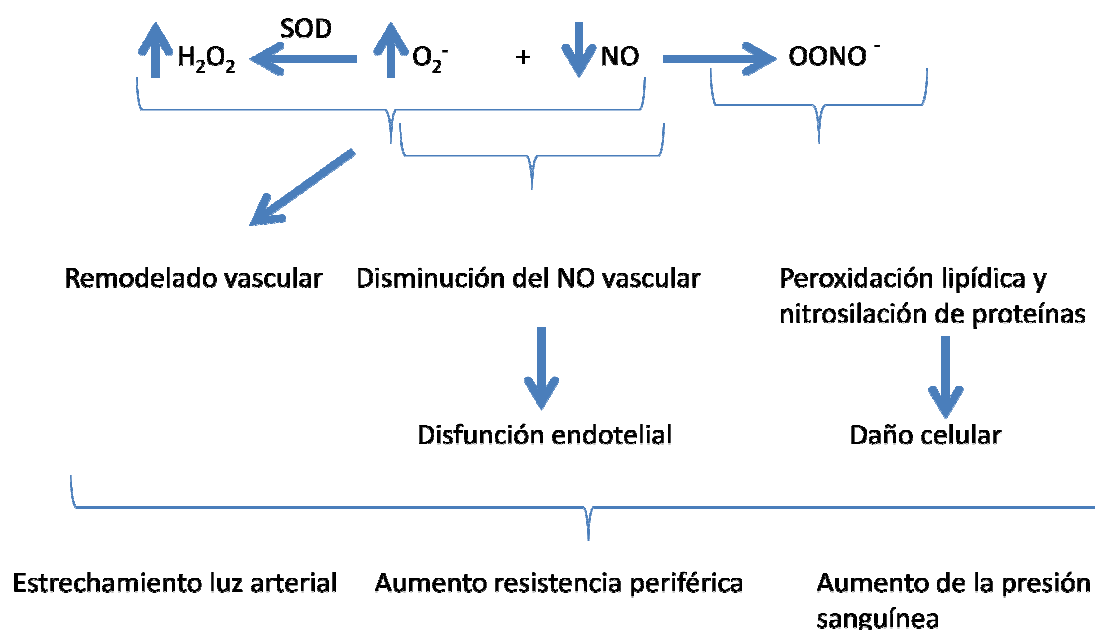


Figura I.6. Mecanismos fisiopatológicos de los ROS en el sistema vascular.

En condiciones fisiológicas las ROS son producidas de manera controlada a bajas concentraciones y funcionan como moléculas de señalización regulando la contracción y relajación de la CMLV y su crecimiento (Touyz et al., 1999). En condiciones patológicas de producción elevada de ROS dan lugar a disfunción endotelial, contractilidad aumentada, crecimiento de las CMLV y apoptosis, migración de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación y aumento de la deposición de proteínas de la matriz extracelular, procesos principales que contribuyen al daño vascular en la enfermedad cardiovascular (Figura I.6).

Varios estudios han establecido el papel de las ROS en los procesos de crecimiento que contribuyen a la lesión vascular y al remodelado. La producción de $\cdot\text{O}_2^-$ por la NADPH oxidasa mediada por los receptores de Ang I es seguida de un aumento intracelular de H_2O_2 que puede participar como segundo mensajero para las respuestas a largo plazo de la Ang II como la hipertrofia o la hiperplasia de las CMLVs.

Las ROS también regulan el modelado vascular por aumento de la deposición de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina. La degradación del colágeno depende de la actividad de unas proteínas conocidas como metaloproteínas (MMPs). Estas MMPs son secretadas por macrófagos y CMLVs de manera inactiva. ROS activa a MMP2 y MMP9, las cuales promueven la degradación de la membrana basal y la elastina, respectivamente, en cultivos de CMLVs humanas (Rajagopalan et al., 1996). En particular el peroxinitrito (OONO^-) aumenta rápidamente la actividad de MMP2 en las arterias coronarias.

La regulación del tono vascular también está implicada en la hipertensión ya que la respuesta relajante dependiente del endotelio está alterada debido a una disminución de la biodisponibilidad de NO. El endotelio libera cantidades pequeñas, pero constantes, de NO, manteniendo así una vasodilatación basal que permite la circulación de la sangre. Esta disminución en la biodisponibilidad de NO puede deberse a una disminución de la síntesis de NO o a un aumento de la degradación de NO por su interacción con $\cdot\text{O}_2^-$ para formar ONOO^- . El peroxinitrito es un débil vasodilatador comparado con el NO y tiene propiedades proinflamatorias (Touyz et al., 2004).

2.3. ROS y remodelado vascular.

Como ya hemos analizado la familia de las ROS abarca varias moléculas las cuales tienen un amplio alcance y efectos divergentes sobre la función celular (Figura I.7). Dentro del sistema cardiovascular, los principales efectos de las ROS incluyen la regulación del crecimiento y diferenciación celular, modulación de la producción y descomposición de la matriz extracelular, inactivación del NO y estimulación de muchas quinasas. Muchos de estos efectos están, en gran medida, asociados con cambios patológicos observados en la hipertensión arterial (Paravicini et al., 2006).

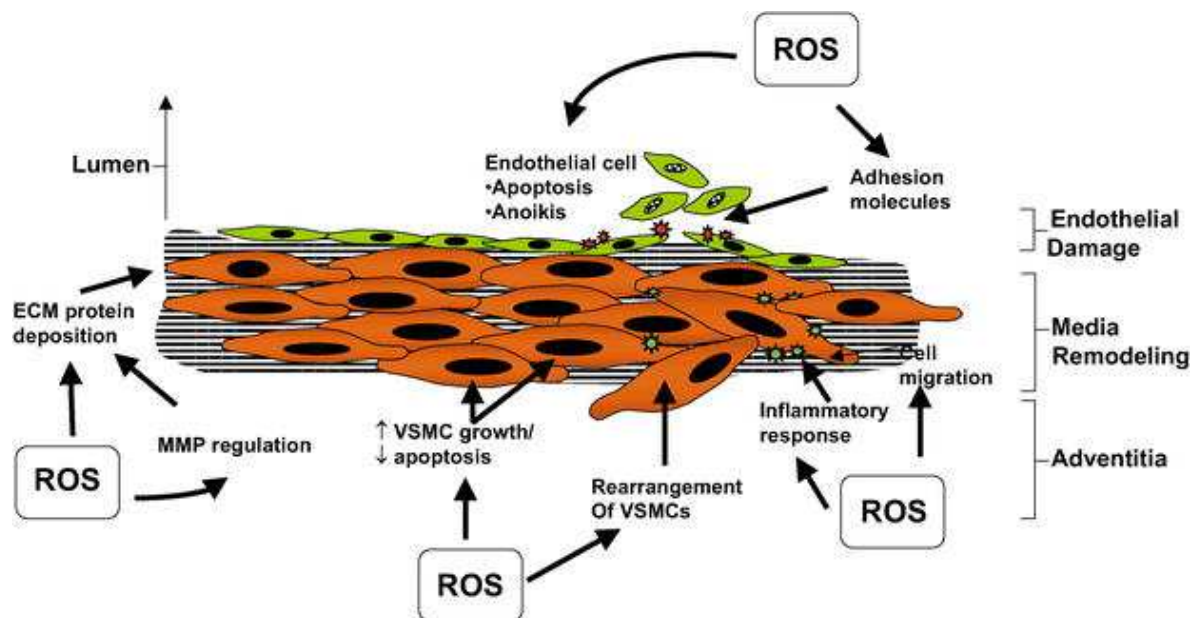


Figura I.7.- Efectos de las ROS sobre los componentes de la pared vascular. (Tomado de Paravicini et al. 2006)

2.3.1. Alteraciones en la túnica íntima vascular

La íntima es la estructura que cubre el interior de las arterias y de las arteriolas. Es una estructura que se considera que está integrada por el endotelio y su membrana basal, el tejido conectivo subendotelial inmerso en una matriz extracelular (MEC) sui generis y la túnica o lámina elástica interna, constituida por la proteína elastina. La población celular de la íntima está representada por elementos celulares de linaje hematopoyético y por tanto, esta población celular es

indiferenciada, totipotente y multipotente y cohabita en una MEC que estimula su diferenciación a células musculares lisas vasculares (CMLVs), células fagocíticas, linfocitos, células plasmáticas, mastocitos, fibroblastos e, incluso, osteoblastos. La túnica o lámina elástica interna tiene la característica de dificultar el tráfico celular en cualquier sentido, es una muralla porosa, que está constituida por millones de fibras elásticas que permite la difusión de factores de crecimiento, neuropéptidos y neurotransmisores, hormonas y metabolitos.

La función de la íntima es la de proteger la media, en arterias y arteriolas, proliferando frente a cualquier tipo de agresión iatrogénica, mecánica, metabólica, inmunológica, viral o bacteriana. La íntima es una estructura avascular, no tiene vasos sanguíneos ni vasos linfáticos (Barrios et al., 2001 y 2002).

Las partes principales de las que está constituida la túnica íntima vascular son:

Endotelio:

El endotelio vascular, un órgano estructuralmente simple y funcionalmente complejo, es una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. Lejos de ser sólo una barrera mecánica entre la sangre y los tejidos, es un órgano activamente comprometido en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos. Debido a su ubicación estratégica detecta cambios en las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre la pared vascular, así como señales químicas transportadas por la sangre y responde a ellas liberando sustancias vasoactivas, algunas de las cuales tienen funciones antagónicas como vasodilatadores (NO), y vasoconstrictores (ET-1, Ang II, anión superóxido) o hemostáticos y antihemostáticos.

Las sustancias liberadas, a través de efectos autocrinos o paracrinos, determinan la participación activa del endotelio en la homeostasis vascular. Fisiológicamente, las diversas funciones que cumple el endotelio no son más que la expresión del balance de las acciones de los distintos principios activos que produce. El resultado neto de ese balance muestra que el endotelio disminuye el tono vascular, debido a que relaja el músculo liso de la pared del vaso, y es inhibidor de la proliferación de ese tejido, inhibe la adhesión y agregación

plaquetaria, deprime la activación del sistema de coagulación, estimula la fibrinólisis, disminuye la permeabilidad capilar e inhibe la adhesión y migración de neutrófilos y macrófagos generadores de inflamación.

El término disfunción endotelial indica que el endotelio no cumple apropiadamente estas funciones. Una menor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), una alteración en la producción de prostanooides (incluyendo prostaciclina, tromboxano-A2 y/o isoprostanos), un deterioro de la hiperpolarización dependiente de endotelio, así como una mayor liberación de endotelina-1, pueden individualmente o asociados contribuir a la disfunción endotelial. Sin embargo, la menor biodisponibilidad de NO, causada por una disminución en su síntesis o un aumento de la velocidad con que se degrada, constituye el fenómeno más temprano y la característica más importante de disfunción endotelial (Figura I.8).

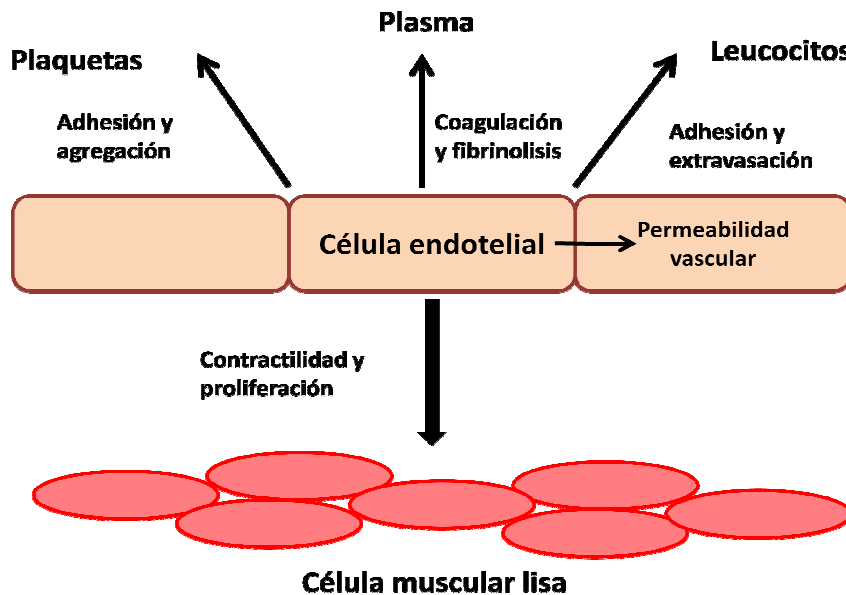


Figura I.8.- Funciones del endotelio vascular

Furchgott y Zawadski (Furchgott et al., 1980) descubrieron en 1980 el papel fundamental del endotelio como regulador de la vasodilatación, al describir el fenómeno de la relajación del músculo liso vascular dependiente de endotelio. Ellos demostraron que anillos arteriales previamente contraídos se podían relajar en respuesta a la acetilcolina sólo si las células endoteliales estaban intactas. Eliminando el endotelio anulaban la vasorelajación producida por acetilcolina, lo cual sugería que estaba mediada por alguna sustancia derivada del endotelio que se demostró posteriormente que era el NO.

El NO difunde al músculo liso vecino, activa la enzima guanilato-ciclasa soluble, por lo cual aumentan los niveles celulares del segundo mensajero GMPc, que a su vez relaja a la célula muscular por disminuir el calcio citosólico necesario para la interacción de las proteínas contráctiles. La mayoría de los estímulos vasodilatadores, como el flujo sanguíneo y numerosos agonistas de receptores de membrana acoplados a proteína G, relajan indirectamente al músculo liso vascular a través de la liberación endotelial de NO. Es importante destacar que muchos de estos agonistas actuando directamente sobre receptores de la célula muscular lisa, de las plaquetas, o sobre proteínas sanguíneas producen vasoconstricción, agregación plaquetaria y/o coagulación. De manera que la respuesta simultánea de un endotelio sano amortigua las consecuencias vasculares de cualquiera de estos efectos.

Por otro lado, técnicas de PCR y Western blot han demostrado la existencia de varios componentes de NADPH-oxidasa en las células endoteliales: tanto en humanos como en ratas se ha comprobado la expresión de Nox2 y p22phox en endotelio de arterias coronarias. En ellas se ha demostrado la expresión de Nox1, Nox4 y Nox5, aunque parece que la forma más abundante es la Nox4. Todas ellas responden ante varios estímulos como Ang II, trombina, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el TNF- α y la IL-1. En condiciones fisiológicas NADPH-oxidasa contribuye a un amplio rango de acciones fisiológicas; sin embargo, en condiciones patológicas aumenta la generación de ROS. Además, se ha demostrado que NADPH-oxidasa tiene un papel importante en el desacoplamiento de la eNOS: animales en los que se produce una hipertensión DOCA-sal muestran un aumento de ROS, que disminuyen cuando estos animales son tratados con L-NAME. Ratones con NADPH-oxidasa knockout muestran menos estrés oxidativo y este no se modifica con L-NAME (Forstermann 2010).

Esta presencia de NADPH-oxidasa en endotelio es importante ya que NO es rápidamente inactivado por sustancias reactivas del oxígeno (ROS) y proteínas de la sangre como la hemoglobina y la albúmina. En presencia de altos niveles de ROS, NO se une al $\cdot O_2^-$ y forma peroxinitrito (ONOO $^-$), disminuyendo la cantidad de NO disponible. Además el peroxinitrito desacopla la eNOS que genera mayor cantidad de sustancias prooxidantes. En procesos inflamatorios de la pared vascular que cursan con altas concentraciones tanto de ROS como de NO, originados no sólo en las células endoteliales sino también en los macrófagos

reclutados, aumenta la formación del altamente reactivo radical peroxinitrito que modifica la estructura y función de distintas proteínas y contribuye a la disfunción vascular presente en patologías como la hipertensión y la aterosclerosis.

Membrana basal

A la lámina o membrana basal, cada vez se le reconoce con mayor precisión su papel como mediador extracelular en la interacción general epitelio-mesénquima. Hoy se reconoce el papel fundamental que juegan la lámina basal y la MEC en la iniciación y mantenimiento de la diferenciación celular. La MEC que sintetizan las CEs y que depositan alrededor de ellas mismas, actúa en un doble sentido: controla su diferenciación y a través de la interacción celular, controla la expresión génica selectiva en las células adyacentes. Se ha propuesto que la MEC no solo influye en la adherencia y migración de la CE, reorganizando su citoesqueleto y en la proliferación de la misma sino también en el comportamiento de la CMLV.

La MEC y la membrana basal son fuente de cascadas de señalización. La información puede ser posicional, hormonal, iónica o de vecindad con otras células. En la membrana celular comienzan las vías de transducción que llegan al núcleo, dependiendo del medio donde se encuentra. El medio ambiente exterior juega un papel fundamental en la iniciación y mantenimiento de la diferenciación celular. En el medio ambiente extracelular encontramos factores de crecimiento, factores que frenan el crecimiento celular, hormonas, moléculas de la MEC e iones. Además, se aprecia la acción de ciertos compuestos como el AMPc, las prostaglandinas y factores séricos en estos procesos de diferenciación. Las hormonas actúan como reguladores importantes en el desarrollo celular, especialmente en los fenómenos de diferenciación y crecimiento. En el proceso de crecimiento tisular se deben tener en cuenta tres aspectos: la iniciación del crecimiento, la tasa de crecimiento y su detención (Baris et al., 2001 y 2002).

Neoíntima

El grosor de esta capa aumenta progresivamente con la edad en condiciones de normalidad y cuando la estructura sufre cualquier tipo de agresión. Entonces hablamos de la formación de una neoíntima que implica patología pero no

existe un límite nítido entre el espesor de la íntima normal y la iniciación de la neoíntima.

Según Kochx (Kochx et al., 1992) se dan tres fases cuando se agrede un vaso:

- Infiltración temprana por polimorfonucleares en la íntima.
- Replicación de las CMLVs de la media.
- Acumulación subendotelial gradual de las CMLVs con depósitos de fibras colágenas y de fibronectina en la neoíntima en formación.

Kochx plantea la posibilidad de que las CMLVs presentes en la neoíntima pueden provenir de células indiferenciadas presentes en la íntima. La proliferación de CMLVs, de fenotipo diferente al de la media, es evidente en la vecindad de la cara de la túnica elástica interna que mira a la luz del vaso. Las CMLVs de la neoíntima ostentan fenotipo secretor y tienen una disposición longitudinal, paralela al de las CEs, siguiendo la dirección del flujo sanguíneo mientras que las CMLVs exteriores de la media tienen una orientación circular. Se observa presencia de fibronectina en áreas de crecimiento celular intenso y varios estudios de investigación indican, que esta macromolécula de la MEC es esencial para la migración celular, la adherencia y la proliferación. La presencia de fibronectina en la íntima ha sido identificada en condiciones de normalidad y durante la hiperplasia de la íntima, especialmente relacionada con la formación de placas fibrosas humanas, lo mismo que en lesiones ateroscleróticas inducidas experimentalmente. El colágeno presente en la neoíntima es de tipo IV cuyas fibras son sintetizadas por las CMLVs en proceso de proliferación (Barrios et al., 2001 y 2002).

De lo que hemos descrito hasta el momento, podemos decir que la íntima sufre hiperplasia e hipertrofia frente a diferentes estímulos y que la célula clave en la formación de la neoíntima es la CMLV, diferenciada posiblemente a partir de células embrionarias, presentes en la íntima, comprometidas y predeterminadas. Para otros autores, en la descripción de la composición de una lesión vascular que cursa con formación de neoíntima, es necesario considerar además el proceso de apoptosis celular como otro mecanismo implicado en el remodelado (Viles-González et al., 2004).

La reendotelización, el engrosamiento intimal y el proceso de remodelado vascular podrían tener un denominador común. La reendotelización se activa por la pérdida de la inhibición por contacto de la replicación, que mantiene el endotelio inactivo, y por la liberación local de factores que específicamente potencian dicha actividad. Estos factores no son del todo conocidos, aunque las investigaciones más recientes atribuyen un papel preponderante al factor de crecimiento de endotelio vascular VEGF (Tsurumi et al., 1997) y al factor de crecimiento derivado de fibroblastos FGF (Lindner et al., 1993). El primero de ellos es sintetizado por las CMLVs y ejerce un efecto trófico de forma relativamente específica sobre las CEs, mientras que el FGF es producido y almacenado tanto en las CEs como las CMLVs, y ejerce efectos sobre ambas. El efecto de estos factores, particularmente del FGF, puede prolongarse en el tiempo ya que puede permanecer activo unido a proteínas de la matriz extracelular. Sin embargo, el endotelio regenerado suele presentar anomalías morfológicas en tamaño, forma y disposición celular, y suele exhibir una funcionalidad alterada semanas después de que la reendotelización haya sido completada (Weidinger et al., 1990).

Por otra parte el efecto antiproliferativo del NO parece estar relacionado con la represión por el NO de la transcripción de genes claves en el ciclo celular (Guo K et al., 1998). Además, el NO parece regular la integridad del endotelio de forma coordinada con el VEGF (Tsurumi Y et al. 1997). Por ello, el NO se considera el sensor más sensible y específico para evaluar la función la función endotelial (Stermerman MB et al., 1997).

Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que a pesar de la importancia del proceso de reendotelización, éste no parece el único determinante del grado final de engrosamiento intimal ya que la adventicia tiene bastante protagonismo en el proceso de remodelado vascular y engrosamiento intimal (Shi et al., 1996).

Lámina elástica

Fisiológicamente los cambios del armazón elástico de la íntima son mínimos porque el tejido elástico del organismo es una de las estructuras más estables.

2.3.2.- Alteraciones en la túnica media

La túnica media está compuesta principalmente por fibras musculares lisas dispuestas de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno. En condiciones normales, la pared vascular debe contar con mecanismos que le permitan con el tiempo adaptarse a las necesidades que demandan los cambios mecánicos generados en el sistema vascular. El desarrollo de mecanismos de adaptación a ciertas situaciones se ve forzado cuando se prolonga en el tiempo pudiendo derivar en patologías en las que se favorece y predispone a la deformación estructural. La distribución de los componentes de la capa media arterial, la penetración de la vasa vasorum en esta capa media y la organización de los engrosamientos subendoteliales, indican la existencia de una respuesta ordenada a las fuerzas mecánicas generadas en el sistema vascular con las subidas de presión (Díez et al., 1995).

La capa media se compone principalmente de CMLVs, que responden al estímulo hipertensivo aumentando su número (hiperplasia) y su tamaño (hipertrofia), así como modificando su distribución (remodelado) y su fenotipo (desdiferenciación a tipo secretor) (Dzau et al., 1988). Como en el caso de la disfunción endotelial, en la patología de la capa media, las consecuencias no son homogéneas en todos los vasos: el estrés biomecánico en las grandes arterias provoca el predominio de la hipertrofia, en las arterias pequeñas la hiperplasia y en las arteriolas se ven mayormente afectadas por el remodelado. En cualquier caso, la aparición y consistencia de la hipertrofia dependen de lecho vascular y del modelo de hipertensión que se considere (Daemen et al., 1995).

Los elementos humorales principalmente involucrados en los procesos de remodelado son la Ang II, la ET-1, la aldosterona y distintos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el FGF y el factor de crecimiento transformante (TGF). La Ang II es un potente mitógeno para las CMLVs (Dubey et al., 1994, 1995, 2002), que induce procesos de remodelado asociado a la hipertensión.

La Ang II es un péptido multifuncional con acciones pleiotrópicas, modulador del tono vascular a través de su efecto vasoconstrictor, regula el crecimiento celular

y la apoptosis, e influye en la migración celular, en el depósito de la matriz extracelular y es a su vez proinflamatorio pues estimula la producción de otros factores de crecimiento, tal como PDGF y agentes vasoactivos como la ET-1. La Ang II juega un papel fundamental en el control de la integridad funcional y estructural de la pared vascular y es importante en los procesos fisiológicos que regulan la tensión arterial y en los mecanismos esenciales de la ECV. Las múltiples acciones desencadenadas por la Ang II son mediadas por vías de señalización celular altamente complejas que se activan tras su unión a receptores ubicados en la superficie celular, AT-1 y AT-2 (Touyz et al., 2000). Las vías de señalización activadas en las células musculares lisas tras la unión de la Ang II con el receptor AT-1 median muchas de las acciones vasculares de la misma, entre ellas el crecimiento vascular que incluyen la activación de la NADPH oxidasa y proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Por otro lado, en varios estudios se ha demostrado que la Ang II a través del receptor AT-2 ejerce un efecto proapoptótico e inhibitorio del crecimiento antagonizando de esta manera la acción de los AT-1, vía activación de las fosfatasa tirosina.

La familia de las Endotelinas (ET-1, ET-2 y ET-3) realiza sus efectos a través de dos receptores (ET_A y ET_B) que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el lecho vascular. Aunque producidas por el endotelio, ejercen sus principales acciones a nivel de la capa media arterial. ET-1 puede ejercer, en el endotelio normal un efecto vasodilatador a través del receptor ET_B ya que aumenta la liberación de NO y PGI₂. Sin embargo en caso de disfunción endotelial se pierde esta propiedad y ET-1 ejerce efectos de remodelación endotelial. Por otro lado, las acciones de ET-1 son más evidentes a nivel de la capa media arterial, aquí produce una verdadera vasculopatía que comienza con los efectos vasoconstrictores mediados por el receptor ET_A y continúa hasta producir una profunda transformación de la morfología vascular. Esto se traduce en la presencia de remodelado de capa media muscular con hipertrofia y fibrosis perivascular. Esta última es especialmente importante ya que ET-1 produce proliferación de fibroblastos que a su vez generan más endotelina.

NADPH-oxidasa está presente en todas las capas vasculares, aunque a nivel arterial su distribución es dependiente del tipo de vaso. Se ha comprobado que solo p22phox y p47phox se expresan en casi todos los lechos arteriales; sin embargo, el primero se expresa más en arterias miocárdicas humanas y el segundo

en arteriolas de resistencia. En las células musculares de aorta humana no se expresan p67phox y Nox2. Sin embargo en células musculares lisas de arterias de resistencia humanas si se expresa la Nox2. Una gran cantidad de mediadores, como Ang II, PGF2 α , TNF- α , LPS y IL-1 α . participan en la modulación de las subunidades de la NADPH oxidasa. (Csányi et al. 2009)

Muchas de las acciones de la Ang II podrían estar provocadas en parte por las ROS, tales como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno que actuarían como segundos mensajeros intra e intercelulares de procesos tanto fisiológicos como patofisiológicos. La influencia que la Ang II ejerce sobre la integridad y la arquitectura de la pared vascular consiste en modular el crecimiento celular y regular la composición de la MEC, de este modo se ha visto que aumenta la producción de factores de crecimiento tales como, el PDGF y el TGF- β , y de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, y estimulan la producción de sustancias quimiotácticas que son importantes en los procesos vasculares inflamatorios asociados con la ECV tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) provocando un reclutamiento de monocitos/macrófagos en la pared del vaso. Probablemente la inflamación y el incremento del estrés oxidativo, actúen como desencadenantes importantes, que pueden ser dependientes de la Ang II y que juegan un papel en los procesos que llevan al remodelado en pequeños y grandes vasos en la hipertensión (Griendling, 2000).

No está claro el papel de la apoptosis en el remodelado vascular, podría tratarse de un mecanismo compensatorio en el aumento de crecimiento vascular que hay en algunas formas de hipertensión. En la HTA, los cambios en la estructura de la pared de las arterias son básicamente de dos tipos (Intengan et al., 2001):

- **Remodelado eutrófico:** Caracterizado porque los diámetros externo e interno disminuyen, hay un incremento en la relación pared/luz y el área de la capa media no se altera. Este tipo de remodelado es el que se presenta en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Mulvany et al., 1996) y en pacientes con HTA esencial leve (Korsgaard et al., 1993).

- **Remodelado hipertrófico:** La capa media crece invadiendo la luz, dando lugar a un incremento del área de la pared así como de la relación pared/luz. Este

tipo de remodelado predomina en la hipertensión severa, tal como ratas Dahl sal sensibles (D'Uscio et al., 1997) y en humanos en la hipertensión secundaria (Rizzoni et al., 1996).

2.3.3.- Alteraciones en la túnica adventicia

La túnica adventicia cubre a los vasos externamente. Corresponde a un tejido conectivo laxo, y posee fibroblastos, colágeno y fibras elásticas orientadas en sentido longitudinal. En ella se presenta la vasa vasorum, que en los de mayor tamaño nutren a las células de la túnica adventicia y la porción más profunda de la túnica media. Estas células tienen mayor dificultad para tomar el oxígeno y los nutrientes desde la luz del vaso. En la túnica adventicia están también los nervios vasomotores simpáticos de los vasos, nervi vasorum, que puede producir vasoconstricción. Los nervios rara vez llegan hasta la túnica media, y por lo tanto no establecen sinapsis con los miocitos lisos. Más bien descargan su neurotransmisor noradrenalina que difunde gracias a las uniones de intersticio. Las arterias están más dotadas de nervios vasomotores que las venas, y también reciben fibras colinérgicas parasimpáticas que producen vasodilatación.

Se ha demostrado que NADPH-oxidasa es activa en fibroblastos de la adventicia y que su actividad puede estimularse por diferentes estímulos como son hormonas, citocinas, y factores metabólicos. En los modelos de hipertensión producidos por la infusión de Ang II varios laboratorios han sugerido que la adventicia es la mayor fuente de superóxido. Pero es que además existen resultados que parecen indicar que las ROS producidas en la adventicia pueden actuar de forma autocrina sobre la capa media arteriolar produciendo el remodelado hipertrófico en la misma. Cuál de las ROS es responsable de este efecto está en discusión pero parece que los mayores candidatos son el superóxido y H₂O₂ (Csányi et al. 2009)

Desde el punto de vista histológico, la fibrosis hipertensiva presenta las características definitorias de estar constituida por el depósito exagerado de fibras de colágeno tipo III inicialmente y de tipo I a medida que el proceso progresa, cuyas fibras se disponen como haces que surcan el intersticio y en torno a los vasos intramiocárdicos. La acumulación de fibras no se limita al ventrículo izquierdo y

también está presente en las otras cámaras cardíacas y la cuantía del depósito de fibras se relaciona inversamente con el número de cardiomiocitos y directamente con el grado de hipertrofia de estos (Weber et al., 1998). El exceso de fibras de colágeno miocárdico presente es el resultado de la combinación de un incremento en la síntesis de colágeno por los fibroblastos y los miofibroblastos y una disminución o ausencia de su degradación por las metaloproteínas de la matriz (Weber et al., 2000). Esta hipótesis se apoya en hallazgos experimentales que muestran una sobreexpresión de los genes del procolágeno tipo I, precursor del colágeno tipo I, y una disminución de la actividad de la colagenasa, enzima encargada de la degradación del colágeno tipo I, en el ventrículo izquierdo hipertrofiado de SHR (Varo et al., 1999 y 2000). La combinación de distintos factores hemodinámicos, humorales, genéticos y ambientales, puede inducir el citado desequilibrio.

3. ESTRÓGENOS Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

3.1.- Hormonas ováricas y enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares, especialmente la cardiopatía isquémica, la hipertensión arterial y el ictus son, en las sociedades industrializadas, las más frecuentes y la primera causa de muerte. La incidencia y la tasa de mortalidad por infarto agudo de miocardio es mayor en hombres entre los 30-50 años que en mujeres de la misma edad, pero a partir de esa edad la tendencia se invierte y la incidencia es más alta en mujeres. Según el Estudio Framingham (Figura I.9) la edad tiene una correlación directa con la morbilidad por enfermedad coronaria; pero también existe un claro incremento de esta patología en la mujer con relación a los hombres según avanza la edad. Podemos observar en la figura que la prevalencia de la enfermedad es superior en hombres, pero a partir de los 45 años, comienzo habitual de la menopausia y la privación de estrógenos, la incidencia de enfermedad coronaria crece en la mujer de manera exponencial, igualando prácticamente al hombre en la década de los 70-80 años.

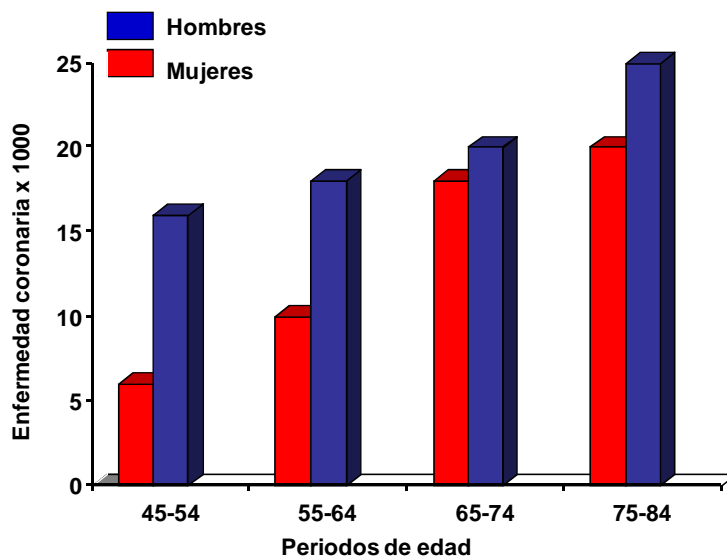


Figura I.9.- Incidencia de enfermedad coronaria según edad y sexo. Datos del Estudio Framingham 2009

Si tomamos solo el grupo de mujeres, la frecuencia de presentación de enfermedad coronaria es mayor en menopaúsicas que en premenopaúsicas. Por otro lado, la presión arterial que aumenta con la edad, se incrementa más en mujeres que en hombres habiéndose demostrado que la pendiente de este aumento es mayor a partir de la menopausia, llegando a superar la presión arterial de los hombres (Figura I.10).

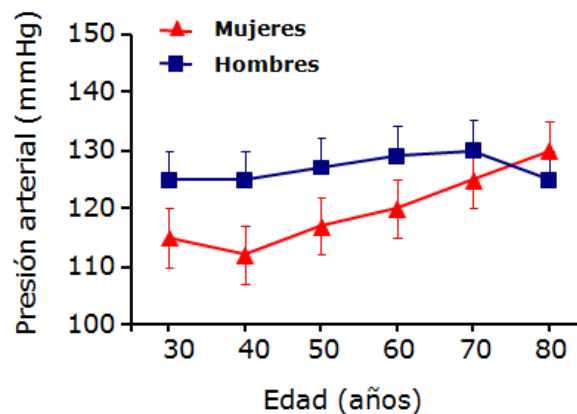


Figura I.10.- Evolución de la presión arterial sistólica en relación a la edad en ambos sexos. (Modificado Hipertensión 54: 11-18, 2009)

Estos hechos se han atribuido, al menos en parte, a los efectos de protección de las hormonas sexuales femeninas, especialmente los estrógenos antes de la menopausia (Barton et al., 2007; Kammel et al., 1995; Ouyang et al., 2006).

Diversos estudios han demostrado que tanto los estrógenos sintéticos como los naturales tienen efectos antiinflamatorios y vasoprotectores.

El 17β -estradiol, estrógeno endógeno natural, ha mostrado causar dilatación dependiente del endotelio en arterias coronarias de hombres y mujeres (Sherwood A et al., 2007). Es importante destacar que estos efectos vasoprotectores de los estrógenos se han observado en la menopausia temprana, tanto en mujeres sanas como aquellas con enfermedad coronaria, pero no en mujeres posmenopáusicas mayores (> 60 años) independientemente de la presencia o ausencia de enfermedad coronaria (Harrington et al., 2003).

3.2.- Receptores de estrógenos

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas, como ya hemos visto, claves en las mujeres que son principalmente sintetizadas en los ovarios y liberadas al torrente sanguíneo. Los niveles de estrógenos descienden drásticamente en la menopausia, lo cual coincide con ese aumento en la susceptibilidad para padecer enfermedades cardiovasculares (Stork et al., 2004).

Los estrógenos ejercen diversos efectos sobre los tejidos diana, incluidos los del sistema cardiovascular, a través de múltiples receptores, con la participación de una compleja interacción de vías de señalización genómicas y no genómicas (Figural.11).

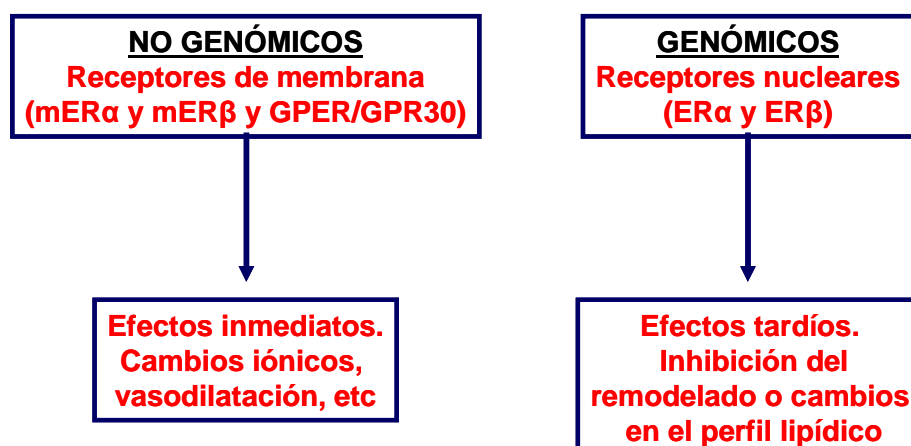


Figura I.11.- Tipos de receptores celulares de estrógenos

El primer receptor de estrógenos que se describió fue el receptor de estrógenos α (ER α). Este fue seguido del descubrimiento del ER β . Ambos receptores tienen múltiples dominios, incluyendo aquellos para la unión de ligandos y la interacción con proteínas de señalización, factores de transcripción, y el ADN del núcleo (Samoncini, 2009). Hoy se conoce que ambos receptores funcionan como ligandos activos de factores de transcripción que residen en el citoplasma. Cuando el estrógeno se une al ligando penetran en el núcleo donde interactúan con Elementos de Respuesta de Estrógenos (ERE), una secuencia reguladora del ADN para así expresar los factores de transcripción y las proteínas responsables de la acción a largo plazo (Meyer et al. 2011).

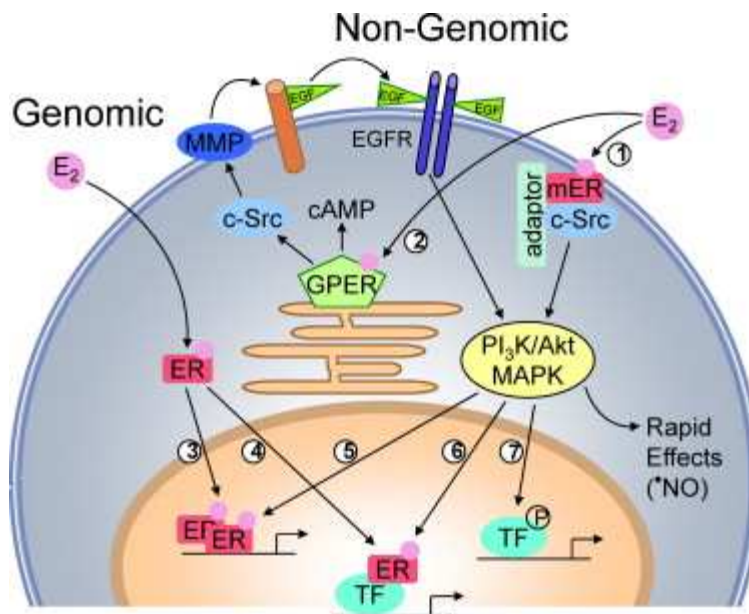


Figura I.12.- Mecanismos genómicos y no genómicos de acción de los estrógenos. (Tomado de Meyer et al. 2011)

Sin embargo, actualmente se concede cada vez mayor importancia a los receptores de membrana que fueron denominados mER α y mER β , aunque actualmente se considera una población de receptores (mER). La interacción del estradiol con dicho receptor activa a una vía de señalización formada por IP3K/MAPK. Un tercer receptor ha sido identificado y clonado el GPR30 que hoy se le denomina EGRP y que se encuentra en retículo endoplasmático. EGRP activa la adenilciclase y aumenta AMPc, metaloproteinas (MMP) e indirectamente IP3K/MAPK. Todos estos receptores median las respuesta de la pared vascular

como son la vasodilatación activa, la inhibición de la proliferación del músculo liso vascular, inhibición de la inflamación y de la fibrosis vascular, el efecto antioxidante y la reparación vascular después de la injuria (Meyer et al. 2011).

3.3. Efectos de los estrógenos a nivel vascular

3.3.1. Acción de los estrógenos en el tono vascular

El tono vascular se define como el grado de contracción del vaso sanguíneo relacionado con el diámetro máximo en estado de dilatación. Bajo condiciones basales los vasos de resistencia y de capacitancia exhiben algún grado de contracción de su musculatura lisa que determina el diámetro o tono del vaso. El tono vascular, influenciado tanto por el endotelio como por el músculo liso vascular, está determinado por multitud de factores vasoconstrictores y vasodilatadores. El endotelio juega un papel importante en el control del tono vascular liberando factores relajantes tales como NO, prostaciclina (PGI₂), factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE) y factores constrictores tales como ET-1, Ang II y prostaglandina H₂/tromboxano A₂ (Orshal et al., 2004). Así los estrógenos promueven vasodilatación por:

- Mecanismos dependientes de endotelio, principalmente por estimulación de la eNOS y la síntesis de factores relajantes como el NO.
- Mecanismos independientes de endotelio, a través de la regulación de la conductancia al calcio y al potasio en la membrana celular
- Descenso en la producción de agentes vasoconstrictores, como productos derivados de la ciclooxigenasa, ROS, Ang II y ET-1.

De esta manera los estrógenos pueden aumentar la relajación dependiente del endotelio en anillos arteriales en diferentes animales y en distintos lechos vasculares aunque es importante tener en cuenta, a la hora de analizar los efectos de los estrógenos que estos dependen del lecho vascular y la especie animal considerada. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la deficiencia de estrógenos está asociada con el estrés oxidativo y con la disminución en la producción de óxido nítrico que sería responsable del incremento de la presión sanguínea en ratas ovariectomizadas (Hernández et al., 2000).

3.3.2. Acción de los estrógenos en el endotelio

Como ya hemos mencionado el endotelio juega un importante papel en el control del tono vascular por la liberación de diversos factores y los estrógenos ejercen una serie de efectos sobre estos factores derivados del endotelio. Se ha demostrado que estos mejoran la relajación dependiente del endotelio en arterias de diferentes animales y de distintos lechos vasculares, incluyendo la mesentérica, aorta y arterias cerebrales. Diversos estudios en seres humanos han demostrado que el tratamiento con estrógenos aumenta el flujo coronario y disminuye la resistencia coronaria y el tono vascular periférico.

- Óxido Nítrico.

El NO es un poderoso vasodilatador y relajante del músculo liso vascular. Se produce de la transformación de la L-arginina a L-citrulina, reacción que es catalizada por las enzimas NOS. Diversos estudios muestran que la liberación basal de NO es mayor en la mujeres en comparación con los hombres, y que la administración de estrógenos en ratas ovariectomizadas restaura el deterioro de la liberación de NO (Nigro et al., 1990; Hayashi et al., 1992). Por otro lado se ha visto que el efecto inhibitor del L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO) sobre la relajación inducida por la acetilcolina es más pronunciado en las arterias meséntéricas de hembras que de machos (Kahonen et al., 1998). Diversos estudios muestran una diferencia en la respuesta al tratamiento con estradiol en machos y hembras, lo cual sugiere una especificidad de género de los efectos vasculares de los estrógenos.

El mecanismo de acción del efecto vasodilatador del estradiol parece ser de tipo genómico y no genómico. Así, la administración de estradiol in vivo e in vitro induce una rápida vasodilatación en arterias coronarias de primates ovariectomizadas con una dieta rica en colesterol, efecto que también se ha visto en otros animales. Este efecto vasodilatador rápido del estradiol puede ser debido, al menos en parte, a la producción de NO ya que desaparece con la administración de inhibidores de la síntesis de NO (Raghvendra et al., 2001).

Los posibles mecanismos envueltos en este aumento de la producción de NO incluyen: 1) la estimulación transcripcional de la expresión de los genes que expresan la NOS, 2) la inhibición de la regulación de la expresión génica de NOS por citoquinas, 3) una modificación postraducciona de las proteínas de la NOS, 4)

el aumento de cofactores o de la disponibilidad de L-arginina, 5) la activación no genómica de segundos mensajeros, por ejemplo Ca^{2+} , AMPc y tirosinquinasa, 6) la traslocación dependiente de calcio de la ubicación de la eNOS unida a la membrana al citoplasma y 7) la modulación de los sistemas de degradación de NO (producción de ROS y antioxidantes) (Tostes et al., 2003).

La inducción de la eNOS Ca^{2+} dependiente por los estrógenos se ha demostrado en varios tejidos, de acuerdo con la presencia de elementos de respuesta a los estrógenos en la región promotora de la NOS. Además de aumentar la producción de NOS, los estrógenos inducen un rápido aumento de la actividad de la NOS y la liberación de NO a través de mecanismos no transcripcionales reduciendo su dependencia a Ca^{2+} , tal vez a través de la fosforilación de la eNOS por mecanismos en los que están involucradas las MAPKs o la proteína kinasa B(PKB)/Akt (Caulin-Glaser et al., 1997). Estos efectos parecen ser mucho más intensos y funcionalmente relevantes que el incremento en la expresión de NOS inducida por los estrógenos e inhibida por antagonistas ERs indicando que los efectos están mediados por ERs que funcionan de manera no genómica activando la eNOS a través de mecanismos dependientes de la MAPK (Figura I.13) (Tostes et al., 2003).

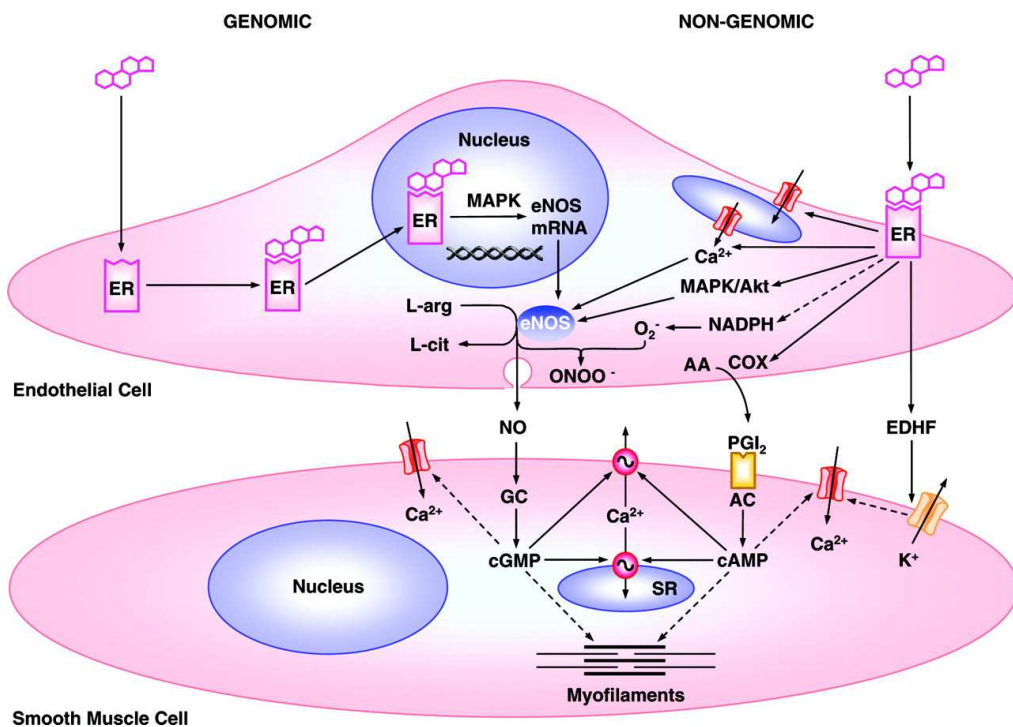


Fig. I.13 Efectos vasculares de los estrógenos. Tomada de Orshal et al., 2004.

Otra vía de actuación de los estrógenos es la fosforilación y activación de la NOSe vía inositol trifosfato (PI3)-kinasa-Akt y de este modo se reducen los requerimientos de Ca^{2+} para su activación (Rusell et al., 2000). También se ha visto que en la estimulación no genómica de la síntesis de NO pueden estar involucradas proteínas intracelulares, tales como la hsp90 que se une y pueden interactuar con los ERs y activar la NOSe (Migliaccio et al., 1996).

El papel que los receptores estrogénicos tienen en el efecto que el estradiol ejerce sobre la síntesis de NO, se demuestra por la inhibición del efecto vasodilatador del estradiol en presencia de ICI-182780, un antagonista de los ERs (Chen et al., 1999), así el papel de los $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$ en la regulación de la síntesis de NO, parece estar mediada por $\text{ER}\alpha$ ya que la síntesis de NO y la relajación en la aorta inducida por el estradiol se ve disminuida en ratones knockout, a lo que les falta el $\text{ER}\alpha$ (Rubanyi et al., 1997; Tostes et al., 2003). De igual modo se ha observado un aumento de la actividad NOSe en respuesta al estradiol en las células endoteliales en las que hay una sobreexpresión de $\text{ER}\alpha$ (Chen et al., 1999).

- Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE)

El FHDE es un mediador importante en la relajación vascular que activa los canales de K^+ activados por Ca^{2+} causando hiperpolarización y relajación del músculo liso. Su liberación está modulada por numerosos factores incluidos agonistas, como la acetilcolina y la bradiquinina, fuerzas de rozamiento y algunas patologías. Su identificación química así como su función característica varía dependiendo del tamaño vascular, del lecho vascular y de la especie. Diversas pruebas demuestran que los estrógenos modulan la producción y liberación de FHDE, así la mayor relajación mediada por el endotelio en las hembras comparadas con los machos puede estar relacionada con la diferencia en la hiperpolarización dependiente del endotelio del músculo liso vascular (Kausser et al., 1994) tal y como demuestra el hecho de que esa diferencia en la hiperpolarización inducida por la acetilcolina en las arterias mesentéricas se elimina en presencia de bloqueantes de los canales de K^+ . Además, la ovariectomía causa una marcada reducción en la hiperpolarización inducida por la acetilcolina que se mejora en presencia de estrógenos como el 17β -estradiol (Sakuma et al., 2002). Estos datos sugieren que los estados de déficit de estrógenos atenúan la relajación producida por FHDE.

- Metabolitos del ácido araquidónico

Las acciones de los estrógenos sobre las células vasculares también influyen en el metabolismo de las prostaglandinas y en la actividad de la ciclooxigenasa (COX), enzima clave en la producción de prostaglandinas. La Cox aumenta la síntesis de PGI₂ la cual produce un aumento de AMPc y una disminución del Ca²⁺ intracelular produciendo vasorelajación (Figura I.14).

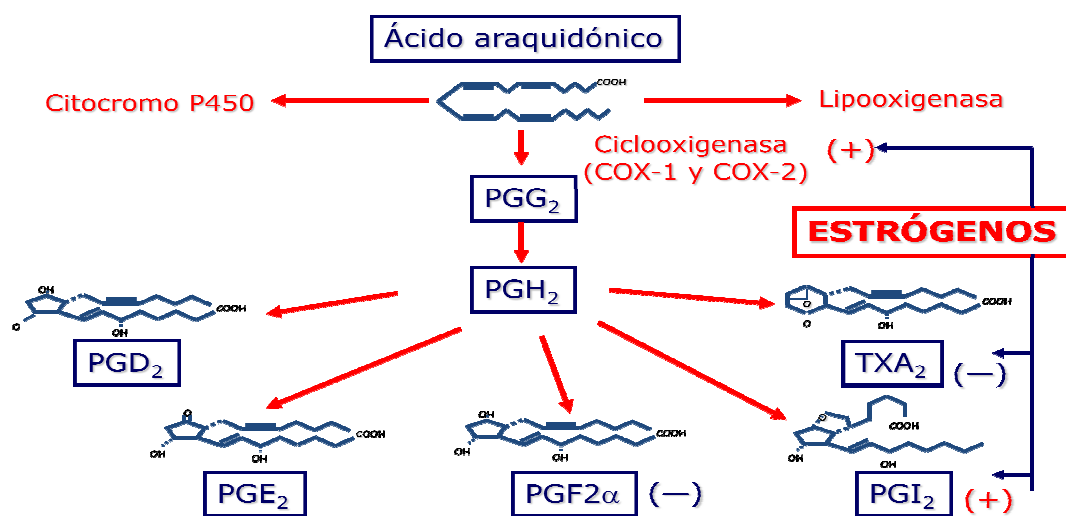


Figura I.14.- Efectos de los estrógenos sobre el metabolismo del ácido araquidónico

Se ha demostrado repetidamente que el 17β-estradiol estimula la producción de prostaglandinas vasodilatadoras como la PGI₂ en una gran variedad de preparaciones como por ejemplo de arterias uterinas ovinas, células endoteliales de arterias pulmonares fetales ovinas, células endoteliales de vena umbilical humana y en vasos sanguíneos y mesentéricos de ratas. Este aumento de los niveles de PGI₂ se ha asociado a un incremento en la expresión de las enzimas claves involucradas en su producción como la fosfolipasa A₂, la COX-1 y la prostaciclina sintetasa (PGIS). Así se ha mostrado en arteria cerebral de ratas sometidas a tratamientos crónicos con 17β-estradiol en las que mejora la producción de la síntesis de PGI₂ por aumento de la COX-1 y PGIS (Ospina et al., 2002). También se ha sugerido que la COX-2 juega un papel específico en la síntesis de PGI₂ inducida por estradiol y la vasodilatación. En células endoteliales de vena umbilical humana, el 17β-estradiol aumenta la liberación de PGI₂ por la COX-2 y no por la COX-1, y en la vasodilatación colinérgica en mujeres postmenopáusicas (Akarasereenont et al., 2000).

Se ha establecido, también, una asociación entre el estradiol y prostaglandinas vasoconstrictoras: 1) los estrógenos previenen la vasoconstricción dependiente de la prostaglandina H sintetasa (PGHS) que se asocia con una sensibilidad aumentada del receptor de PGH₂ y del tromboxano A₂, en arterias mesentéricas de ratas SD ovariectomizadas, 2) los estrógenos mejoran la vasodilatación en arterias mesentéricas aisladas de ratas Fisher disminuyendo la contracción dependiente de PGHS-2 y la expresión de PGHS-2, y 3) los estrógenos disminuyen la síntesis de metabolitos de la COX, el tromboxano principalmente, que provocan contracción.

Por otra parte se ha visto que la ovariectomía aumenta la reactividad a la norepinefrina y disminuye la sensibilidad a la acetilcolina en microvasos de ratas SHR mientras que el tratamiento con estradiol o estradiol más progesterona restablecen la respuesta alterada. También se ha observado en ratas SHR que inhibidores de la COX, indometacina, diclofenaco y ridrogel (antagonista del receptor de la TXA₂ e inhibidor de la tromboxano sintetasa) también reestablecen la respuesta a norepinefrina y acetilcolina.

Como ya se mencionó, no todas las arterias responden de la misma manera al estradiol. Así se ha visto que los tratamientos con estradiol y progesterona provocan alteraciones en la expresión de proteínas y enzimas claves envueltas en la producción de PGI₂, fosfolipasa A₂, COX-1 y PGIS en arterias uterinas y sistémicas.

Estas acciones moduladoras de los estrógenos sobre la vía de la COX parecen estar mediadas por la activación de los ERs. En células endoteliales de arteria pulmonar, la producción de PGI₂ está mediada por el ER β ya que se inhibe con ICI182780 que es un inhibidor no selectivo para cualquiera de los ERs y con un antagonista específico del ER β . Por otro lado, la observación de que los estrógenos aumentan los niveles de COX-1 en vasos sanguíneos cerebrales de ratones pero inefectivo en ratones knockout ER α , sugiere que la regulación de la COX-1 por ER α también parece contribuir a los efectos de los estrógenos.

- Endotelina-1

La endotelina-1 es un vasoconstrictor y péptido mitógeno que puede jugar un papel en la patogénesis de la enfermedad vascular. Los estrógenos pueden

actuar en diferentes puntos de la cascada ET-1: en su formación, a nivel de receptores y también en la respuesta inducida por la ET-1. La ET-1 interactúa con los receptores ET_A y ET_B. La activación del ET_B endotelial causa la liberación de varios factores relajantes que promueven la relajación del músculo liso vascular. La liberación de ET-1 en las células endoteliales parece estar disminuida en las mujeres y ello puede explicar el menor tono vascular y presión arterial en las hembras al compararlas con machos SHR (Kahonen et al., 1998). La síntesis y actividad biológica de la ET-1 está regulada por los estrógenos, como lo sugiere el hecho de que el 17β-estradiol disminuye la vasoconstricción inducida por la ET-1 en arterias coronarias tanto in vitro como in vivo. Del mismo modo en células endoteliales de aortas porcinas en ausencia de hormonas ováricas femeninas se ha observado un incremento de la expresión de ARNm de preproendotelina y aumento de la liberación de ET-1. Junto a este dato se ha visto que tanto el estradiol como sus metabolitos 2-hidroxiestradiol y 2-metoxiestradiol inhiben la síntesis basal de ET-1 en las células endoteliales en arterias coronarias porcinas, posiblemente por un mecanismo independiente de los ERs (Dubey et al., 2001).

En lo que se refiere a la especie humana se ha observado un incremento del número total de receptores ET-1 en vena safena de hombres en comparación con las mujeres y una relación receptores ET_A/ET_B diferente, favoreciendo el efecto vasodilatador en mujeres (Tostes et al., 2003). Este dimorfismo sexual en la respuesta vascular a la ET-1 también se ha visto en ratas SHR. Por otro lado en estudios realizados en mujeres postmenopausicas sanas que reciben tratamiento con estrógenos se ha observado que dicho tratamiento aumenta los niveles plasmáticos de nitritos/nitratos y disminuye los niveles de ET-1 (van Baal et al., 1999).

- Moléculas de adhesión

En un proceso inflamatorio, citoquinas y otros mediadores de la inflamación provocan notables cambios fenotípicos en las células endoteliales. Las células endoteliales activadas liberan NO y PGI₂, dando lugar a vasodilatación, que a su vez facilita la llegada de leucocitos a los sitios de la lesión. Las células endoteliales activadas por citoquinas expresan moléculas de adhesión para leucocitos, E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1.

Muchos tipos celulares que participan en la respuesta inmune e inflamatoria responden a estrógenos, incluyendo los linfocitos T y B, monocitos, macrófagos y

mastocitos. Las acciones de los estrógenos sobre los marcadores inflamatorios parecen depender de los niveles de estrógenos. A concentraciones fisiológicas, los estrógenos aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1, TNF- α e IL-6 por los monocitos. Sin embargo los sujetos con altos niveles de estrógenos, como las mujeres premenopáusicas, tienen niveles más bajos de proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) que los sujetos con niveles bajos de estrógenos, como las mujeres posmenopáusicas, y la terapia hormonal sustitutiva disminuye los niveles de MCP-1 en plasma (Koh et al., 2001). El aumento en el TNF- α inducido por los estrógenos activa la adhesión endotelial de leucocitos a través de un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 (Cid et al., 1994). Estudios realizados de ARNm para las moléculas de adhesión endotelial, muestran que, en los primeros momentos el tratamiento con estrógenos da lugar a un aumento en los niveles de ARNm para estas moléculas de adhesión, pero que en momentos posteriores las células tratadas con estrógenos muestran unos niveles más bajos de ARNm para estas citoquinas (Koh et al., 2001). Sin embargo, a dosis altas o farmacológicas de estrógenos y después de grandes periodos de exposición, los estrógenos disminuyen la expresión de moléculas de adhesión inducidas por citoquinas en cultivos de células endoteliales (Caulin-Glaser et al., 1996).

- Estrés oxidativo y ROS

Los efectos vasculoprotectores de los estrógenos se han atribuido parcialmente al cambio de la relación NO/O₂⁻ en la pared vascular, aumentando la biodisponibilidad de NO. Muthusami et al (2005) han demostrado que la ovariectomía aumenta la lipoperoxidación lipídica y el H₂O₂ y disminuye los enzimas antioxidantes SOD, GP_x y GST. La ovariectomía produce, por tanto, un aumento de la actividad de la NADPH oxidasa y una disminución de la SOD, junto al aumento de presión estimula la forma inducible de la NOS. Cuando ésta se activa puede generar hasta 10000 veces más de NO que la eNOS. A estas concentraciones el NO es tóxico y forma con el superóxido peroxinitritos que tienen efectos inflamatorios en el territorio vascular. En cultivos realizados de células endoteliales humanas de vena umbilical, el 17 β -estradiol disminuye la expresión de la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa y regula la expresión de la eNOS, mejorando el balance NO/O₂⁻ (Wagner et al., 2001). Por otro lado, el estradiol aumenta la actividad del factor de relajación derivado del endotelio en la aorta torácica de ratas ovariectomizadas en ausencia de cambios en la actividad o el gen NOS.

Estudios realizados con quimioluminiscencia producida por lucigenina, un indicador de la producción de O_2^- , detectaron una disminución de la quimioluminiscencia en la aorta de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol, lo que sugiere una disminución de la generación de O_2^- derivada del endotelio y una mayor actividad biológica del NO, así como un descenso en la liberación de peroxinitrato (Barbacanne et al., 1999). Estudios de nuestro grupo (Hernández et al. 2000) han demostrado que el aumento de estrés oxidativo y la disminución de la producción de NO debido a la deficiencia de estrógenos se ha asociado, en ratas ovariectomizadas, con mayores niveles de presión arterial, y que el tratamiento con estrógenos disminuye los niveles de nitritos/nitratos (Figura I.15), la concentración de grupos SH y de MDA (malondialdehído) y disminuye la de la presión arterial.

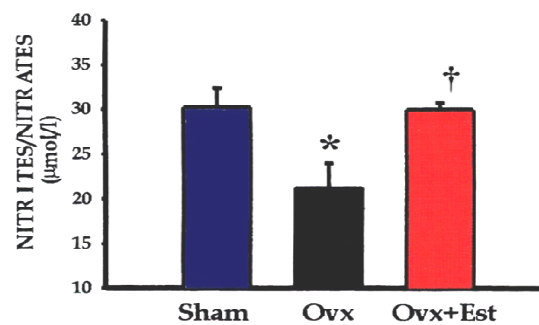


Figura I.15.- Efecto de la ovariectomía y del tratamiento con estrógenos a los animales ovariectomizados sobre el nivel de nitritos.(Tomada de Hernández et al. 2000)

En humanos se ha sugerido que la disfunción endotelial secundaria debida a la deprivación de estrógenos está causada por una reducción en la disponibilidad de NO por la producción de estrés oxidativo dependiente de COX (Viridis A et al., 2000).

- Angiotensina II

Los estrógenos actúan sobre el sistema renina-angiotensina en diferentes puntos de la cascada: en la formación de Ang II, a nivel de los receptores de Ang II o sobre las respuestas inducidas por Ang II. Se ha demostrado que los estrógenos aumentan la expresión génica y los niveles plasmáticos de angiotensinógeno. Los estrógenos también tienen efectos sobre los niveles de renina en la circulación: 1) las mujeres bajo terapia hormonal sustitutiva con estrógenos presentan niveles de renina más bajos que aquellas que no están sometidas al tratamiento, 2) las mujeres premenopáusicas muestran niveles más bajos de renina que las

posmenopáusicas, y 3) las mujeres presentan niveles más bajos de renina que los hombres.

Se ha demostrado que la deficiencia de estrógenos aumenta los niveles de ARNm del receptor 1 de Ang II (AT1), así como la eficacia de la Ang II sobre la vasoconstricción debido al aumento de la densidad de receptores AT1. La terapia de reemplazo con estrógenos en ratas ovariectomizadas invirtió la sobreexpresión del receptor AT1.

También se ha estudiado la acción de los estrógenos sobre la enzima ECA responsable de la conversión de la Ang I en Ang II y se ha demostrado que la actividad de esta enzima en la circulación y los tejidos está reducida bajo terapia hormonal sustitutiva en varios modelos animales ovariectomizados. Asimismo el tratamiento con estrógenos muestra que niveles reducidos de ECA en los tejidos, riñón y aorta, iban acompañados paralelamente de una reducción en las concentraciones del ARNm para esta enzima (Figura I.16).

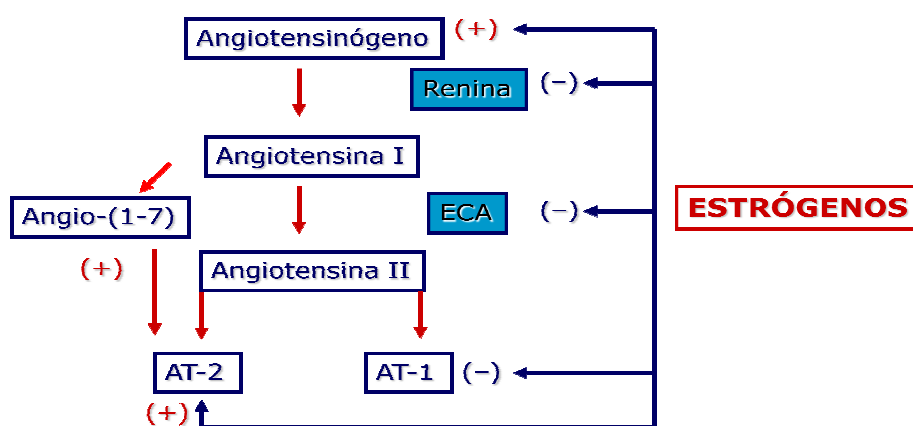


Figura I.16.- Efecto de los estrógenos sobre el sistema renina-angiotensina

Los datos clínicos obtenidos de mujeres posmenopáusicas que recibieron estrógenos conjugados equinos durante 3 meses mostraron una reducción significativa de la actividad plasmática de la ECA que se correlaciona con un aumento de la vasodilatación mediada por el endotelio mediada por NO y un aumento de los niveles séricos de nitritos/nitratos. Sin embargo, otros autores han observado que la administración aguda de estradiol no produce cambios en la actividad vascular de la ECA o en la respuesta vasoconstrictora a Ang I ó Ang II.

3.3.3.- Acción de los estrógenos sobre las células del músculo liso vascular.

Se ha demostrado que los estrógenos tienen también efectos directos sobre las células del músculo liso. La presencia de ERs en las CMLV indica claramente que estas células son diana de los estrógenos y que estos tienen un efecto directo sobre ellas. Así los estrógenos pueden modular numerosas funciones de las CMLV como son la contractilidad, la proliferación, la formación y composición de la matriz extracelular. Estos efectos pueden explicar algunos de los mecanismos involucrados en la protección de los estrógenos contra la injuria vascular (Farhat et al., 1996). Hay una serie de observaciones que demuestran que el 17 β -estradiol puede jugar un papel selectivo regulando el tono del MLV bien sea modulando o modificando la permeabilidad de los canales iónicos en las CMLV. Así por ejemplo, se ha visto que los estrógenos causan vasodilatación en vasos desprovistos de endotelio, sugiriendo que inducen una inhibición del tono vascular independiente del componente endotelial, involucrando en dicha inhibición una acción directa sobre las CMLV. Por otro lado también se ha observado que los estrógenos causan relajación en cerdos y conejos desprovistos de endotelio y en arterias coronarias humanas previamente contraídas con ET-1 y PGF2 α , en una solución despolarizante con alta cantidad de KCl.

El efecto vasodilatador de los estrógenos no parece estar mediado por los receptores nucleares y citosólicos clásicos estimulando la síntesis proteica, sino a través del efecto directo de los estrógenos sobre los receptores de membrana en el MLV (Orshal et al., 2004).

- Canales de potasio

Las acciones del estradiol sobre los canales de K⁺ se han descrito tanto en las células endoteliales como en el músculo liso, así en estudios funcionales se ha demostrado que el 17 β -estradiol relaja las arterias coronarias porcinas por medio de mecanismos independientes del endotelio involucrando en ello la salida de K⁺. Estas acciones pueden llevarse a cabo a través de los canales de K⁺ sensibles a ATP, ya que la relajación que el dietilestilbestrol provoca en aorta aislada de rata es inhibida por glibendamida y por tetraetilamonio. Por otro lado se ha demostrado que el 17 β -estradiol tiene un potente efecto estimulador de los canales de potasio activados por calcio (BKCa) y el bloqueo de dichos canales en arterias intactas

inhibe la relajación inducida por los estrógenos. El efecto que tiene el 17β -estradiol sobre los canales BKCa se bloquea inhibiendo la actividad de una proteína quinasa dependiente de GMPc por lo que hay autores que proponen que el 17β -estradiol produce relajación en arterias de cerdo mediante la apertura de los canales BKCa a través de una fosforilación dependiente de GMPc (White et al., 1995).

- Canales de calcio.

Distintos trabajos han sugerido que los estrógenos modulan la entrada o liberación de Ca^{2+} intracelular en las CMLV. Así en experimentos realizados en aorta de rata usando como transportadores soluciones libres de Ca^{2+} y con los depósitos de Ca^{2+} deplecionados, el 17β -estradiol reduce significativamente la contracción, sugiriendo esto que el 17β -estradiol disminuye la máxima contracción inducida por la norepinefrina debido a una restricción en la entrada de Ca^{2+} , por lo tanto induce relajación debido a que inhibe la entrada de Ca^{2+} extracelular en las CMLVs. Además el 17β -estradiol en ausencia de Ca^{2+} extracelular relaja las arterias pre-contraídas con norepinefrina, lo que sugiere que esta hormona inhibe la liberación de Ca^{2+} intracelular, efecto debido posiblemente a la interacción directa con la membrana celular o con las proteínas del canal iónico. También se ha visto que concentraciones farmacológicas de estradiol reducen la entrada de Ca^{2+} a través de la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L y disminuyen la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y por lo tanto la contracción del músculo liso (Tostes et al., 2003).

4. ESTRÓGENOS Y REMODELADO

Uno de los mayores riesgos de padecer enfermedad cardiovascular (ECV) es la edad. El problema se complica si tenemos en cuenta el sexo, ya que, como hemos dicho anteriormente y ampliaremos después, las mujeres que están protegidas antes de la menopausia frente a la ECV, parece que pierden dicha protección tras la deprivación estrogénica. Según progresa la edad aparecen disfunción endotelial y alteraciones en la capa de musculo liso arterial: la morfología arterial se modifica con la edad y se asocia con un incremento del diámetro arterial y engrosamiento de la pared. Existe también una infiltración del espacio subendotelial, aumento en la deposición de colágeno, elastina y proteínglucanos,

además de una clara infiltración de leucocitos y macrófagos. Por tanto, con la edad y la menopausia aumenta el remodelado vascular.

El dato hemodinámico más destacado en la hipertensión arterial (HTA) es el aumento de la resistencia vascular al flujo sanguíneo. Esta mayor resistencia arterial puede ser debida a cambios funcionales (presencia de sustancias vasoconstrictoras) o estructurales (remodelado). En la hipertensión, el cambio morfofuncional de la estructura arterial puede ser de dos tipos: el remodelado eutrófico y el remodelado hipertrófico (Figura I.17).

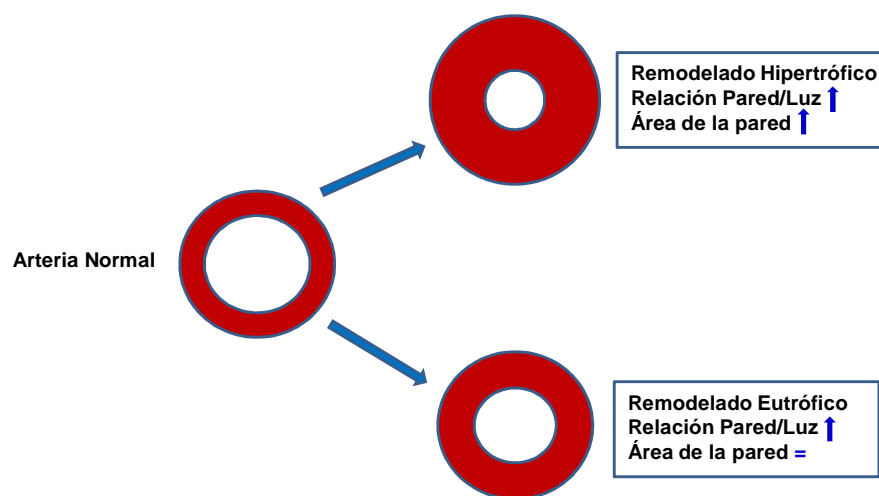


Figura I.17.- Tipos de remodelado vascular

En el remodelado eutrófico el área de la pared permanece igual o está ligeramente disminuida y la relación pared/luz está aumentada. Este tipo de cambios se encuentran en la hipertensión esencial humana y en algunos modelos de HTA experimental. En el remodelado eutrófico la pared arterial se reestructura y las células se alinean más cercanas; además se dan de forma simultánea procesos de crecimiento y apoptosis y no suele acompañarse de grandes modificaciones de la matriz extracelular.

El remodelado hipertrófico se caracteriza por un engrosamiento de la capa media, que invade la luz del vaso y un aumento del área de la pared. Esta forma se da en la hipertensión humana de tipo secundario (renovascular) y en modelos de HTA experimental que cursen con altos niveles de ET-1, como la HTA modelo DOCA-sal. El crecimiento de la capa media determina una disminución de la luz del

vaso y supone un incremento en el número de células, su tipo o su tamaño y un aumento de deposición de la matriz extracelular que determina un incremento de la fibrosis perivascular. El aumento de deposición de matriz extracelular a nivel perivascular puede ser debida a un incremento en la deposición de colágeno y otras proteínas o una disminución de su destrucción. Esta última posibilidad parece demostrada, ya que en muchos tipos de HTA existe una disminución de la actividad de las metaloproteinasas, enzimas que digieren distintos tipos de colágeno (Intengan and Schiffrin, 2000)

Existen múltiples datos sobre los mecanismos que subyacen a los cambios morfológicos que supone el remodelado. Aunque en un principio se especuló sobre si este cambio estructural arterial es causa de la HTA, por aumento de la resistencia vascular; hoy existe total acuerdo que las modificaciones de la geometría arterial son la consecuencia de los aumentos de tensión sobre las paredes arteriales. Hay que tener en cuenta que en condiciones normales las células musculares lisas vasculares (CMLVs) tienen básicamente una función contráctil; sin embargo frente a los aumentos de presión arterial, estas células pierden parte de esta función y responden frente a estímulos que desencadenan su crecimiento y los cambios morfológicos que determinan el remodelado. El primer factor que ha sido implicado en este fenómeno es la angiotensina II (AngII) que produce contracción del vaso, angiogénesis e hiperplasia de las CMLVs. Otros vasoconstrictores también han sido propuestos como mediadores de este fenómeno especialmente la ET-1. Estos autacoides estimulan la generación de ROS que a su vez y a través de una serie de mecanismos intracelulares activan diferentes vías de señalización que producen el remodelado vascular. ROS potencian las quinasas reguladoras extracelulares (ERKs), las quinasas activadoras de las proteínas mitogénicas (MAPKs) ambas estimulantes del crecimiento celular. Además, también los ROS modulan el aumento de deposición de proteínas de la matriz extracelular (Fortuño et al. 2005).

Por el tema de nuestro trabajo, merece un punto y aparte la relación de estrógenos y remodelado. Los estrógenos modulan la respuesta al daño vascular, alterando la expresión o acción de diversos factores de crecimiento, moléculas de adhesión y citoquinas. Sin embargo, quizás sean las ROS el mayor mecanismo implicado en estos cambios. Otro importante mecanismo implicado en la respuesta vascular a la injuria que es modulada por los estrógenos implica la producción de NO. La eNOS se expresa en las células endoteliales y está regulada por los

estrógenos. La iNOs no se encuentra en los vasos normales, pero se expresa en los vasos dañados. Cuando se activa iNOS produce 1000 veces más NO que la eNOS. A estas concentraciones el NO es tóxico ya que se une a los radicales para producir oxidantes biológicos muy tóxicos: en ausencia de estrógenos esta reacción está parcialmente inhibida (Xing et al. 2009).

Nuestro grupo, que como ya hemos señalado anteriormente demostró que la ovariectomía (OVX) provoca un aumento del estrés oxidativo y que este se corrige con el tratamiento estrógeno (Hernández et al. 2000), ha publicado recientemente varias observaciones sobre el papel de los estrógenos sobre la presión arterial y el remodelado vascular. En ratas espontáneamente hipertensas (SHR) la OVX produce un aumento de la tensión arterial acompañada de un cambio en la morfología vascular con remodelado eutrófico. Estos cambios se corrigen con el tratamiento de los animales OVX con 17β -estradiol. Además los resultados mejoran si al estrógeno se le añade un inhibidor del enzima convertidora de angiotensina (García et al. 2005 y García et al. 2006). Sin embargo, según nuestro criterio queda una pregunta por resolver: si la deprivación de estrógenos produce aumento del estrés oxidativo ¿podría ser este el mecanismo último por el que la falta de estrógenos produce un aumento del remodelado vascular en la hipertensión?

5. ESTRÓGENOS E INGESTA

5.1. Regulación de la ingesta

Existen distintos centros en el hipotálamo que intervienen en la regulación de la ingesta de alimento. Los núcleos laterales hipotalámicos actúan como centros del hambre ya que su estimulación provoca hambre y apetito. Por el contrario, los núcleos ventromediales controlan la saciedad y su estimulación provoca el rechazo del alimento. Se sabe que otros núcleos hipotalámicos, los paraventriculares y arqueados, también controlan la ingesta. Los mecanismos que regulan la cantidad de alimentos ingerida son complejos y dependen de señales que parten del propio aparato digestivo, de glándulas endocrinas relacionadas con el metabolismo energético y sustancias producidas en el tejido adiposo. Vamos a repasar brevemente estos mecanismos de regulación para después discutir la influencia de los estrógenos en dichos mecanismos. La colecistoquinina (CCK) que se libera en

el duodeno ante la presencia de grasas en el quimo inhibe la ingesta. Igualmente el neuropéptido Y (NPY) que se produce en el íleon y colon produce en ratones una reducción de la ingesta que dura más de doce horas. La insulina también disminuye el apetito. Por el contrario, la grelina una hormona liberada por las glándulas oxínticas del estómago cuyos niveles aumentan en sangre durante el ayuno estimularía el apetito y la ingesta de alimentos. Señales procedentes del tejido adiposo provocan una compleja serie de respuestas a nivel central. La leptina es una hormona peptídica liberada por los adipocitos. Cuando los depósitos corporales de grasa aumentan liberan más hormona que llega a nivel del sistema nervioso central y ocupa los receptores de leptina que existen en el hipotálamo. La estimulación de los receptores de leptina pone en marcha diversos mecanismos para reducir los depósitos de grasa, entre ellos la inhibición de la ingesta.

5.2. Estrógenos y obesidad

Con la menopausia, la mujer sufre diferentes cambios de tipo metabólico con aumento de peso, aumento del panículo adiposo y aumento de LDL. Esta obesidad postmenopáusica, que se debe a la deprivación estrogénica se la considera responsable de un incremento en el riesgo para ciertas patologías que afectan a la mujer, como diabetes, hipertensión y enfermedades cardíacas. También se ha comprobado que el tratamiento hormonal sustitutivo (THS) reduce el incremento de peso y la cantidad de tejido adiposo (Butera, 2010). A nivel experimental se ha demostrado que la ovariectomía produce en ratas un significativo incremento de peso. En efecto, es bien conocida la relación entre las hormonas esteroideas sexuales y el tejido adiposo. Se ha demostrado que el peso corporal, especialmente la cantidad de tejido adiposo, en hembras de ratas ovariectomizadas aumenta acompañado de un incremento de la ingesta de comida. Este aumento de peso, que sigue a la ovariectomía, se revierte con el tratamiento de estrógenos. Sin embargo, aunque se han implicado en este hecho varios factores, en la actualidad el mecanismo responsable no ha sido completamente establecido.

5.2.1. Efectos centrales de los estrógenos.

Diversos autores (Butera, 2010) han demostrado que parte de los efectos de los estrógenos sobre la ingesta se deben a las acciones de estos sobre los centros hipotalámicos que controlan la ingesta. Estos efectos se deberían a la interacción del estradiol con los receptores estrogénicos a nivel de diversas regiones del cerebro, aunque no se ha establecido con seguridad que tipo de receptor (ER α ó ER β) participa en esta acción.

5.2.2. CCK y estrógenos.

El estradiol aumenta las señales que inhiben el apetito durante las comidas y el mecanismo podría estar mediado por la CCK. La CCK se libera por las células intestinales durante las comidas y ejerce un efecto inhibitorio sobre la ingesta. Diversos trabajos experimentales han demostrado que el tratamiento con estradiol en ratas ovariectomizadas potencia los efectos inhibitorios sobre la ingesta de una inyección intraperitoneal de CCK (Asarian et al., 1999). Además, la administración de un antagonista de los receptores de CCK atenúa el efecto anoréxico del estradiol en ratas ovariectomizadas.

5.2.3. Interacción del estradiol con otros péptidos.

La grelina es un péptido descubierto en 1999 (Kojima et al., 1999) segregado por el estómago que estimula la secreción de hormona del crecimiento y que tiene efectos estimulantes sobre la ingesta. El ayuno aumenta los niveles de grelina, la comida suprime su secreción y su administración aumenta la ingesta en animales de experimentación. Recientes trabajos (Butera, 2010) han demostrado que el estradiol aumenta la secreción de grelina y potencia sus efectos inhibitorios sobre apetito e ingesta. La participación del NPY en la relación entre ausencia de estrógenos y obesidad no ha sido completamente establecida.

Desde el descubrimiento en 1994 de la leptina por Zhang et al. (Zhang et al., 1994) muchos trabajos han estudiado las posibles interacciones de esta hormona con el estradiol en el control de la ingesta de alimentos. La leptina es una hormona péptidica de 16 kDa segregada por las células adiposas y que controla la cantidad de grasa corporal, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la ingesta y promoviendo el

metabolismo energético. Se ha demostrado que existe una correlación entre la concentración de leptina en suero y el peso corporal. Sin embargo los datos que relacionan esta hormona con el aumento de peso que se produce en la privación de estrógenos son complejos. Después de la ovariectomía los niveles plasmáticos de leptina no se modifican, aunque disminuyen los receptores a la hormona tanto en el tejido adiposo como en el hipotálamo (Kimura et al., 2002). Sin embargo, en mujeres postmenopáusicas obesas se ha demostrado altos niveles de leptina en sangre. En conclusión, no queda establecido un papel definitivo de la leptina para explicar la interacción del estradiol con la obesidad.

6. MODELOS ANIMALES DE HIPERTENSIÓN

En los últimos 70 años se han desarrollado diversos modelos de enfermedad cardiovascular y en concreto de hipertensión arterial (HTA). El primer animal al que se le indujo una HTA fue producido en el laboratorio de Goldblatt en 1934 al estrechar mecánicamente la arteria renal de un perro (Goldblatt et al., 1934). Desde entonces y hasta la fecha la puesta a punto de diferentes modelos ha crecido de forma exponencial evolucionando hasta hoy en que se producen por manipulación genética. El objetivo que se busca, con el estudio de estos modelos, es doble: por un lado se pretende profundizar sobre los mecanismos fisiopatológicos que se encuentran en el origen y desarrollo de la enfermedad hipertensiva en el ser humano y por otro conocer la respuesta ante los distintos tratamientos antihipertensivos.

Básicamente dos son las categorías en que podemos clasificar a los grupos de animales en los que provocamos el desarrollo de una HTA: modelos genéticos y no genéticos, que podrían equipararse respectivamente en humanos a la clasificación clínica de la HTA en sus formas primaria y secundaria (Figura I.18).

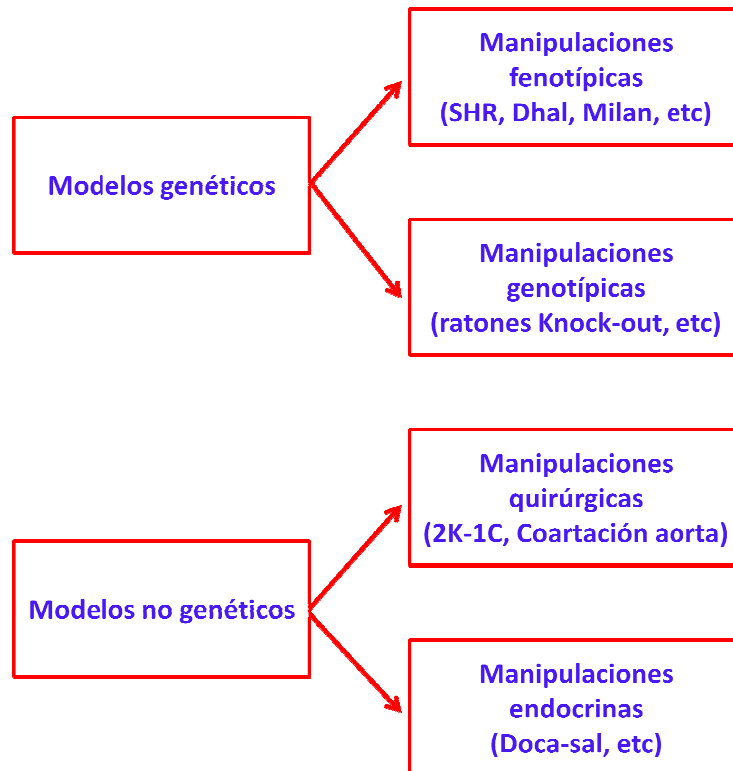


Figura I.18. Modelos animales de hipertensión

Dentro de los modelos obtenidos por manipulación genética cabría considerar dos subgrupos: los conseguidos a través de manipulaciones fenotípicas (SHR, Dhal, Milan) y los obtenidos por alteraciones genómicas (ratones knock-out). Entre los modelos que podemos denominar como no genéticos podemos clasificar dos grupos: los producidos por métodos quirúrgicos, que pretenden alterar la perfusión de ciertos órganos como el riñón (2R-1C, coartación aórtica, etc) y los que modifican las características endocrinas del animal (DOCA-sal, etc)

Aunque, como luego desarrollaremos con mayor amplitud, en la mayoría de estos modelos experimentales aparecen complicaciones cardiovasculares y renales semejantes a las que ocurren en el humano, es preciso señalar que existen importantes diferencias entre la patología que se produce en estos modelos y la enfermedad humana (McGiff y Quilley. 1981).

De entre los distintos modelos de hipertensión experimental, para la realización de este trabajo hemos elegido dos tipos: el modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR) por su semejanza con la hipertensión esencial o primaria en el humano y el modelo DOCA-sal secundario a una manipulación

endocrina y que podría tener puntos en común con la hipertensión secundaria en patología humana, especialmente con la forma de hipertensión por exceso de mineralocorticoides.

6.1. Modelo SHR

En 1963 Okamoto y Aoki publicaron un trabajo en el que demostraban que cruzando ratas con los mayores niveles de tensión arterial se obtenía una nueva raza que mantenía la hipertensión (Okamoto et al., 1963). El aumento de presión comienza después de la 3ª semana de vida y aumenta de forma progresiva hasta alcanzar los 180 mmHg. La hemodinámica muestra que el aumento de presión se debe a un incremento de las resistencias vasculares acompañado de una disminución del gasto cardíaco y del volumen sistólico. La fase maligna de la hipertensión se caracteriza por un mayor incremento de las resistencias vasculares. Este cuadro y su evolución son semejantes al descrito en la enfermedad humana como hipertensión primaria o esencial.

6.1.1. Mecanismos fisiopatológicos en SHR

Mucho se ha discutido sobre los mecanismos que explican el origen y mantenimiento de la hipertensión SHR. Aunque se han descrito algunas alteraciones estructurales a nivel del sistema nervioso, parece que una alteración en los mecanismos catecolaminérgicos centrales que se acompaña de una exagerada respuesta a los vasoconstrictores podría contribuir al desarrollo de la HTA. La exagerada respuesta presora al estrés mental se ha empleado como argumento a favor de la participación del sistema nervioso central en el mantenimiento de la HTA.

Por otro lado distintos sistemas humorales han sido implicados en este modelo de hipertensión. Así, se ha observado en SHR signos de hipertrofia de la corteza suprarrenal y de las células hipofisarias productoras de ACTH acompañadas de una disminución de los niveles de la actividad plasmática de renina. Igualmente se ha descrito una disminución de los niveles de ANP. El posible papel fisiopatológico del NO en la HTA de las SHR ha sido objeto de debate. Se han descrito tanto aumentos como disminuciones de la función del NO (Torök, 2008).

No obstante, se ha demostrado que la respuesta de la relajación dependiente de endotelio a acetilcolina es menor en SHR que en los correspondientes controles WKY. Este hecho puede atribuirse a dos causas: una menor producción de NO o a un aumento de factores vasoconstrictores dependientes de endotelio. Se ha especulado que la anormalidad en SHR sería que su aumentada actividad simpática no puede ser contrabalanceada con una menor biodisponibilidad de NO. Ello podría ser secundario a una menor síntesis y/o a un aumento en la degradación de NO por su interacción con el anión superóxido para formar peroxinitrito. (Sommers et al., 1999).

6.1.2. Hipertensión y estrés oxidativo en SHR.

Existen múltiples evidencias experimentales que relacionan un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la hipertensión experimental y sus complicaciones. Un aumento de ROS con producción del anión superóxido puede causar importantes alteraciones en los sistemas de transducción de señales a nivel celular caracterizado por una mayor producción de inositol trifosfato y reducción de la generación de GMP cíclico en las células vasculares, todo lo cual determina una mayor tendencia a la vasoconstricción. Diversas pruebas experimentales demuestran en ratas SHR un aumento en la actividad de NADPH-oxidasa con incremento en la producción de radical superóxido en plasma y tejidos vasculares. Todo ello parece demostrar una gran sensibilidad de los tejidos vasculares de las SHR al estrés oxidativo.

Por otro lado, parece que en este modelo de hipertensión existe un desequilibrio entre la producción de ROS y NO. Así, la administración crónica de N-acetil-cisteína, un antioxidante con un grupo tiol, disminuye la PAS en ratas SHR jóvenes. Este efecto de la N-acetil-cisteína podría ser por un doble mecanismo, por un lado una disminución de los niveles de ROS y por otro a un aumento en la producción de NO. Como la mayor fuente de ROS en el árbol vascular es la actividad aumentada de la NADPH-oxidasa se ha estudiado el efecto que sobre la PAS tiene los tratamientos con Apocinina: en SHR jóvenes disminuye la presión arterial y el remodelado cardiaco y renal que acompañan a la HTA. Parecidos efectos tienen los tratamientos con vitamina C y E (Kojsova et al., 2006).

6.1.3. Hipertensión y remodelado vascular en SHR.

En 1978 Mulvany et al. determinaron que los vasos de resistencia (mesentéricas) de SHR presentaban una menor diámetro y un aumento del grosor de la capa muscular media que sus controles normotensos (WKY), concluyendo que el aumento en las resistencias periféricas se debía a los citados cambios estructurales, es decir, que el remodelado vascular precedería al desarrollo de la hipertensión. Por otro lado, se ha señalado que en la HTA existe una predisposición genética que podría determinar un aumento del tono simpático acompañado de una hipertrofia de la capa media en los vasos de resistencia. En el caso de las SHR se ha descrito un incremento del contenido de norepinefrina en tejidos, junto a una disminución de la relación pared/luz en arterias mesentéricas que precede al aumento de presión. Ello parece indicar que estos cambios en la estructura vascular serían un mecanismo causante de la hipertensión. Sin embargo, otros resultados apuntan a que el remodelado es causado por el aumento de presión arterial o por modificaciones moleculares: así se ha demostrado que un aumento de la tensión intravascular, del tono simpático y angiotensina II, serían mecanismos suficientes para explicar la hipertrofia del músculo liso vascular.

Un mecanismo, que merece especial atención para explicar el remodelado vascular en este modelo, es el aumento del estrés oxidativo. Se ha demostrado que en animales hipertensos que sufren vasoconstricción crónica existe un aumento del radical superóxido y esto se acompaña de una disminución de la vasodilatación dependiente de endotelio. También se ha comprobado que la superóxido dismutasa previene los cambios vasculares y aumenta la supervivencia de los animales hipertensos. Sin embargo, el mecanismo más admitido que puede influenciar la hipertrofia vascular es una disminución de la biodisponibilidad de NO producida por su inactivación por el superóxido y de tal forma que el NO no puede realizar sus efectos inhibidores sobre el crecimiento vascular (Integan, 2001).

Los cambios cuantitativos y estructurales de la matriz extracelular son fundamentales para el remodelado vascular. Es más, con la vasoconstricción crónica los vasos pueden modificar su composición y perder sus propiedades vasodilatadoras. La deposición de colágeno, la relación colágeno/elastina y la expresión de las integrinas alfa 3 y alfa 5 están aumentadas en SHR en comparación a los animales normotensos. El aumento de matriz extracelular puede

ser también consecuencia de una disminución en la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) que degradan las proteínas de la matriz extracelular. Cambios en la actividad de estas MMPs son responsables en la acumulación de los colágenos tipos IV y V y de la fibronectina en las arterias de resistencia de ratas SHR (Schiffrin, 2004).

6.2. Modelo DOCA-sal.

La hipertensión por aumento en la ingesta de sal es una hipertensión volumen dependiente que fue investigada por primera vez por el grupo de Guyton en 1963 (Langston et al. 1963). En sus experimentos utilizaron perros a los que se había resecado el 70% de la masa renal: cuando se sometieron a una sobrecarga salina (0.9% de ClNa) la presión arterial se fue elevando progresivamente hasta alcanzar niveles hipertensivos.

Aunque en el ser humano existe una baja incidencia de hipertensión secundaria a un aumento de volumen, se han descrito varios casos de enfermos de Addison que desarrollaron una hipertensión maligna después de ser tratados con DOCA (acetato de 11-deoxicorticosterona) (Figura I.19) (Loeb et al. 1939).

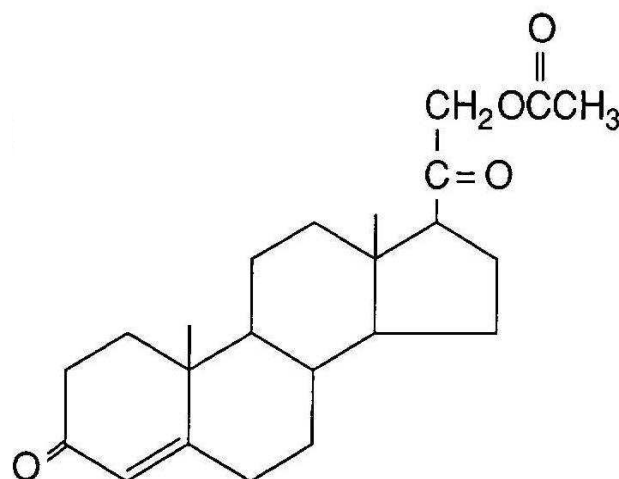


Figura I.19.- Deoxycorticosterona acetato

6.2.1. Mecanismos fisiopatológicos en DOCA-sal

Una de las características del modelo DOCA en ratas, es la necesidad de someterlas a un exceso en la ingesta de sal para conseguir un aumento mantenido de la presión arterial. De hecho el modelo de hipertensión experimental tipo DOCA se consigue uninefrectomizando al animal y sometiendo a una ingesta de agua con una concentración del 1% de ClNa. Evidentemente, esto determina una importante expansión de volumen que se refleja en la hemodinámica cardíaca, en una primera fase de la HTA, en un aumento de cerca del 30% del gasto cardíaco acompañado de un significativo aumento del volumen sistólico. Posteriormente, se produce por el incremento en la presión o por la retención de sodio y agua, un fenómeno que ha sido denominado “escape de sodio” y que consiste básicamente en la pérdida renal de sodio y agua. En esta segunda fase de la HTA el gasto cardíaco disminuye hasta normalizarse y la HTA se mantiene por un incremento de las resistencias vasculares. El mecanismo de estos cambios hemodinámicos no ha sido completamente aclarado, pero podría deberse al fenómeno de “autorregulación corporal total” enunciado por Guyton en 1969: el aumento de perfusión tisular por el aumento del volumen y del gasto cardíaco determina una vasoconstricción generalizada que es la responsable del incremento de las resistencias vasculares (Guyton et al., 1969).

La hipertensión DOCA-sal se acompaña de un descenso en los niveles de Péptido Natriurético Atrial (PNA) y de la actividad del Sistema Renina-Angiotensina (SRA) que parece no tener un papel patogénico importante como mecanismo hipertensivo, como lo demuestran los niveles casi indetectables de la actividad de renina plasmática y el nulo efecto que tiene sobre la presión el tratamiento de estos animales con inhibidores de la formación de Angiotensina II.

Existen, sin embargo, bastantes evidencias de la participación del sistema nervioso central en el mantenimiento de los altos niveles de presión arterial, posiblemente mediados por los efectos centrales del ClNa: sus infusión a nivel intraventricular determina un incremento en la presión arterial. Igualmente, durante un tiempo, la vasopresina fue implicada en la patogenia de la HTA DOCA-sal, hoy este extremo está muy discutido y existe un general consenso que el mayor responsable de la hipertensión en este modelo es la Endotelina-1 (ET-1).

6.2.2. Hipertensión y estrés oxidativo en DOCA-sal.

Las endotelinas comprenden una familia de tres péptidos de 21 aminoácidos (ET-1, ET-2, ET-3) y de 31 aminoácidos (ET-11-31, ET-21-31, ET-11-31). Las endotelinas se sintetizan como una molécula biológicamente inactiva (big ET-1) que se transforma en la forma activa por los Enzimas Convertidores de Endotelinas (ECEs) y que actúa sobre dos receptores ET_A y ET_B que se encuentran distribuidos en múltiples células del sistema cardiovascular y renal, especialmente en el endotelio vascular, células del músculo liso vascular y cardiomiocitos. La estimulación de estos receptores en la célula vascular estimula a la Fosfolipasa C y determinan un aumento del Ca⁺⁺ intracelular y una activación de diversas Proteín Kinasas (PKC). A través de estos y otros mecanismos de activación (PLD, MAPK, ERK1/2) se regula el tono del músculo vascular, y a largo plazo su crecimiento.

La participación de ET-1 en la hipertensión DOCA-sal ha sido ampliamente estudiada, entre otros, por el grupo de Schiffrin (Schiffrin, 2005). Este grupo ha demostrado que en este modelo experimental, los antagonistas de los receptores a endotelina disminuyen la presión arterial y reducen los cambios morfológicos en vasos cardiacos y renales, mejorando la disfunción endotelial y el estrés oxidativo.

Como ya anteriormente señalamos, la mayor fuente de producción de radicales superóxidos en el territorio vascular es un aumento en la actividad de NADPH-oxidasa. Por otro lado, como acabamos de discutir, el principal mecanismo fisiopatológico implicado en la hipertensión DOCA-sal es el aumento de ET-1. Y se ha demostrado que ET-1, actuando a través del receptor ET_A activaría a NADPH-oxidasa y aumentaría la producción de superóxido. Sin embargo, no solo por medio de este mecanismo ET-1 aumenta la producción de ROS, también estimula a Xantina-oxidasa y aumenta la expresión de eNOS y COX-2 (Callera et al., 2008).

6.2.3. Hipertensión y remodelado vascular en DOCA-sal.

Es una observación conocida en clínica que los hombres desarrollan con mayor frecuencia HTA que las mujeres premenopáusicas y que esta diferencia se iguala al comparar hombres con mujeres menopáusicas. En los modelos animales de hipertensión, los machos presentan una HTA más severas que las hembras. Este hecho es especialmente destacado en la hipertensión DOCA-sal. En este

modelo en el que ET-1 juega un importante papel en la patogénesis de la HTA, los animales hipertensos machos tienen mayor actividad de pro.ET-1 mRNA en los vasos que las hembras y esta diferencia desaparece después de la ovariectomía de las ratas hipertensas hembras.

En el modelo DOCA-sal se ha descrito que junto al aumento de presión arterial se produce hipertrofia cardíaca, inflamación, disfunción endotelial y fibrosis perivascular. Además, las complicaciones vasculares, cardíacas y renales se encuentran asociadas a la actividad de la ET-1. El remodelado de la matriz extracelular (MEC) determina un aumento de la fibrosis intersticial miocárdica y perivascular. El aumento de la deposición de colágeno puede ser debido a un desequilibrio entre síntesis y degradación de la MEC. La síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos comienza por un precursor, el pro-colágeno, cuyos dos extremos moleculares son hidrolizados por proteinasas específicas que dan lugar al colágeno que tiene la capacidad de unirse entre sí para formar las fibras de colágeno. La degradación de colágeno y de la MEC se lleva a cabo por parte de las metaloproteinasa (MMP) o colagenasas que a su vez son inhibidas por el inhibidor tisular de MMP (ITMP). Se ha demostrado que en la hipertensión DOCA-sal aumenta la deposición de colágeno con un paralelo incremento de las MMP y de ITMP (Ammarguella et al. 2002).

Por otro lado, también se ha descrito remodelado en la estructura de los vasos de resistencia provocados por ET-1, con un incremento de la capa muscular media sin cambios en el área de la sección transversal del vaso y acompañado de una disminución del diámetro de relajación arteriolar. Si bien ET-1 parece ser responsable de los cambios estructurales descritos y del aumento en la deposición de colágeno, el mecanismo final de su acción podría estar mediado por sus efectos activadores sobre NADPH-oxidasa: ratones deficientes en enzimas prooxidantes no desarrollan, cuando se le induce una hipertensión DOCA-sal, ni remodelado vascular ni fibrosis perivascular (Ko et al. 2007).

7. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los factores de riesgos específicos de las mujeres para la enfermedad cardiovascular son la ovariectomía, la preclampsia y la menopausia. La prevalencia de enfermedad cardiovascular (ECV) en la mujer está muy ligada a la edad. En la figura I.20 podemos apreciar datos de dicha prevalencia en ambos sexos y desde los 20 a los 80 años de edad, dichos datos son los acumulados entre los años 2005 a 2006. Dentro de ECV se incluyen a la enfermedad coronaria, insuficiencia cardiaca e hipertensión arterial (HTA). Se aprecia claramente que entre los 20-40 años la incidencia de ECV es claramente menor en la mujer que en el hombre y cómo a partir de la edad de la menopausia los porcentajes se igualan e incluso se superan por parte de la mujer.

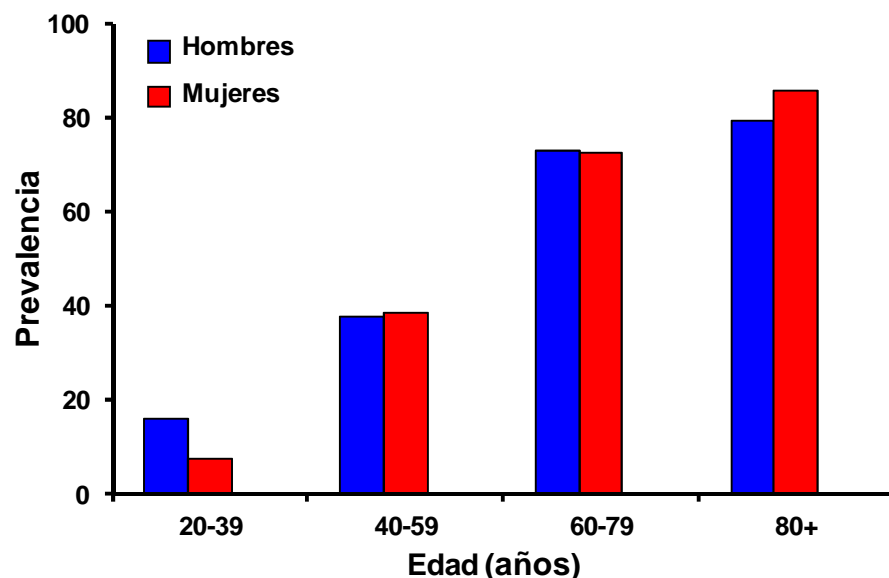


Figura I.20.- Prevalencia de enfermedad cardiovascular en población USA según edad y sexo (National Health Survey 2005-2006: Mackman y Smyth 2009).

Por otro lado, es conocido el hecho que la presión arterial evoluciona de forma distinta en hombres y en mujeres, presentando éstas una elevación a partir de la menopausia (Figura I.21). También se sabe que la HTA es más común en hombres de 30 a 45 años que en mujeres de la misma edad, sugiriendo que existen diferencias de sexo en los mecanismos de control de la presión arterial. Además, la prevalencia de HTA es mayor en mujeres postmenopáusicas que en premenopáusicas, sugiriendo que las hormonas sexuales femeninas y especialmente los estrógenos, tienen un efecto protector sobre el árbol vascular.

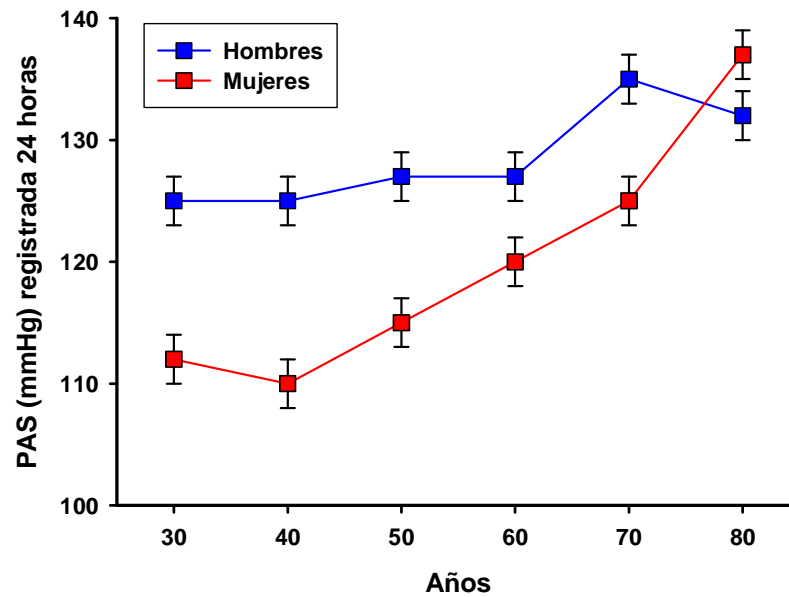


Fig. I.21. Evolución según la edad, de la PAS en ambos sexos en población USA. (Rechelhoff 2005)

Sin embargo, diferentes estudios clínicos presentan resultados contradictorios sobre los efectos beneficiosos del tratamiento hormonal sustitutivo (THS) en la ECV en mujeres menopáusicas. Diversos trabajos han mostrado un beneficio sustancial (reducción del 50% de la enfermedad coronaria) de la terapia hormonal en mujeres que comienzan el tratamiento en la premenopausia o menopausia temprana (Grodstein et al. 2000). Sin embargo, en ensayos realizados con THS en mujeres con 10 años o más de menopausia, es decir después de muchos años de privación de estrógenos, el tratamiento no solo ha demostrado ser ineficaz sino que en el grupo estudiado (mujeres comprendidas entre los 60 y 80 años) se ha demostrado un aumento en la enfermedad coronaria (Anderson et al., 2000; Grady et al., 2004; Manson et al., 2003).

Las posibles razones de esta paradoja, de los efectos vasculares beneficiosos o neutrales en la menopausia de mujeres jóvenes del THS, frente a los efectos perjudiciales en las mujeres de más edad, han sido ampliamente discutidas en la literatura. Muchos autores han propuesto la “hipótesis del tiempo” que postula que las vías de señalización de los estrógenos se alteran en las mujeres mayores de tal manera que convierten efectos antiinflamatorios y vasoprotectores en efectos proinflamatorios y vasculotóxicos (Phillips et al., 2005; Miller et al., 2003; Miller et al., 2005).

Por tanto, son necesarios más estudios que definan los eventos celulares y moleculares en los que están involucrados los estrógenos y otras hormonas ováricas y cómo interactúan con los procesos que protegen o dañan los vasos sanguíneos. Estos hallazgos podrían allanar el camino a nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de las enfermedades vasculares y de otros trastornos asociados a la menopausia como osteoporosis, sofocos, etc (Xing et al., 2009).

En páginas anteriores hemos discutido los múltiples mecanismos por medio de los cuales los estrógenos pueden ejercer sus efectos beneficiosos y como en ausencia de estos esteroides se desencadenan distintos problemas vasculares. Recientemente se ha propuesto que un aumento del estrés oxidativo podría ser el mecanismo último por medio del cual la ausencia de estrógenos se convierte en un factor de riesgo en la mujer menopáusica. Experimentalmente Muthusami et al (2005) han demostrado que la ovariectomía aumenta la lipoperoxidación lipídica y el H_2O_2 y disminuye los enzimas antioxidantes SOD, GPX y GST. La ovariectomía produce, por tanto, un aumento de la actividad de la NADPH oxidasa y una disminución de la SOD, ello junto al aumento de presión estimula la forma iNOS. Cuando ésta se activa puede generar hasta 10000 veces más de NO que la eNOS. A estas concentraciones el NO es tóxico y forma con el superóxido peroxinitritos que tienen efectos inflamatorios en el territorio vascular (Xing et al., 2009). En cultivos de células endoteliales humanas de vena umbilical, el 17β -estradiol disminuye la expresión de la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa y regula la expresión de la eNOS, mejorando el balance NO/O_2^- (Wagner et al., 2001).

En los últimos años, nuestro grupo ha aportado diferentes datos a estos problemas. Así, se ha demostrado que la ovariectomía (OVX) aumenta en ratas control, la PAS, las resistencias vasculares y de los marcadores de estrés oxidativo y que el 17β -estradiol normaliza estos cambios hemodinámicos y moleculares (Hernández 2000). También y utilizando el modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR) (García et al. 2005), han comprobado como la OVX produce un aumento de la PAS junto al remodelado vascular de las arterias miocárdicas y que el tratamiento con 17β -estradiol normaliza estos cambios. Más recientemente, (Bonacasa et al., 2008), utilizando un modelo similar pero compuesto por machos y hembras, demostraron que el 2-metoxiestradiol, un metabolito activo del 17β -estradiol, protege a la vasculatura del remodelado producido por la HTA en ratas

OVX del modelo SHR y que dicho efecto es debido en parte a una disminución de la generación de peroxinitrito.

Por todo ello, en la presente tesis doctoral, nos hemos propuesto analizar, en dos modelos de hipertensión experimental semejantes a las formas primaria y secundaria en humanos, si la inhibición de la formación de radicales libres de oxígeno con Apocinina, que impide el ensamblaje de la NADPH oxidasa y elimina el aumento de su producción, reduce y mejora el remodelado vascular producido por la privación de estrógenos.

De entre los distintos modelos de hipertensión experimental, para la realización de este trabajo hemos elegido dos tipos: el modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR), por su semejanza con la hipertensión esencial o primaria en el humano y el modelo DOCA-sal secundario a una manipulación endocrina (tratamiento crónico con Doca: acetato de deoxicorticosterona) y que podría tener puntos en común con la hipertensión secundaria por exceso de mineralocorticoides en patología humana. La hipertensión DOCA-sal, que presenta una retención de volumen, se caracteriza por ser en sus comienzos una HTA dependiente de volumen. Sin embargo, en su fase final existe un gran aumento de las resistencias vasculares posiblemente por los altos niveles de Endotelina-1(ET-1). Este aumento de ET-1 también estimularía la actividad de la NADPH-oxidasa y explicaría el aumento de oxidación en este modelo. En el modelo SHR, en el que nuestro grupo ha demostrado que la falta de estrógenos incrementa el remodelado vascular (García et al., 2005), diversas pruebas experimentales demuestran que existe un aumento en la actividad de NADPH-oxidasa, posiblemente mediado por la Angiotensina II (Ang.II) con incremento en la producción de radical superóxido en plasma y tejidos vasculares.

II. OBJETIVOS

Nuestro grupo ha demostrado que en el modelo de hipertensión experimental SHR la privación de estrógenos producida por la ovariectomía bilateral induce un cambio estructural en las arteriolas (remodelado vascular) que determina un incremento en la presión arterial. El mecanismo último por el que la falta de estrógenos produce estos cambios es desconocido. Nuestra hipótesis es que un aumento de estrés oxidativo producida por la ausencia de estrógenos podría ser responsable de los cambios morfológicos arteriales y de los aumentos de presión arterial.

Objetivo 1.- Estudiar si en el modelo de hipertensión experimental DOCA-sal, semejante a la hipertensión secundaria en humanos, la privación de estrógenos produce remodelado arterial y cambios en la presión arterial. Para ello:

- 1.1. Se desarrollará el modelo de hipertensión experimental DOCA-sal
- 1.2. Se medirá la evolución de los cambios de presión arterial en los animales DOCA-sal y en los DOCA-sal ovariectomizados.
- 1.3. Se valorarán los cambios estructurales en los vasos miocárdicos de los animales DOCA-sal y DOCA-sal ovariectomizados.
- 1.4. Se comprobará que los cambios inducidos por la ovariectomía revierten después del tratamiento de estos animales con 17β -estradiol.

Objetivo 2.- Estudiar si la inhibición de la actividad de la NADPH-oxidasa mejora los cambios estructurales arteriales y los incrementos de presión arterial causados por la privación de estrógenos en el modelo DOCA-sal. Para ello:

- 2.1. Se tratarán a los animales DOCA-sal ovariectomizados con Apocinina y se analizará si revierten los cambios estructurales y hemodinámicos.

Objetivo 3.- Estudiar si la inhibición de la actividad de la NADPH-oxidasa mejora los cambios estructurales arteriales y los incrementos de presión arterial causados por la privación de estrógenos en la rata SHR, un modelo muy semejante a la hipertensión esencial humana. Para ello:

3.1. Se medirá la evolución de los cambios de presión arterial en los animales SHR y en los SHR ovariectomizados.

3.2. Se valorarán los cambios estructurales en los vasos miocárdicos de los animales SHR y SHR ovariectomizados.

3.3. Se tratarán a los animales ovariectomizados con Apocinina y se analizará si revierten los cambios estructurales y hemodinámicos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Para la realización de los protocolos experimentales se han utilizado dos modelos de hipertensión diferentes:

- Ratas hembras SD (Sprague Dawley) de 5 semanas con un peso aproximado de 100 gr al inicio de los experimentos. Estos animales se utilizaron para la inducción de la hipertensión DOCA.

- Ratas hembras de 10 semanas de vida de la cepa SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). Esta cepa, como ya hemos comentado anteriormente se corresponde a un modelo de hipertensión de base genética que se desarrolla con la edad, como en el caso de la hipertensión esencial humana.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de Helsinki, el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre y el Consejo de la Sociedad Americana de Fisiología sobre el cuidado, protección y uso de animales de experimentación.

2. GRUPOS EXPERIMENTALES

2.1. Modelo de hipertensión DOCA sal.

Para este modelo se utilizaron ratas hembras SD de 100 gr de peso inicial. A estos animales, una vez medida la presión sistólica basal, se les realiza nefrectomía unilateral izquierda. Para ello los animales se anestesiaron por inhalación a base de isoflurano (Forane, Abbot Laboratories. Madrid, España). Estos animales se tratan con una inyección intramuscular semanal de 12,5 mg/rata de DOCA (sal-acetato de desoxicorticosterona) desde el momento de la nefrectomía. Para la preparación de la inyección la DOCA se emulsiona en una mezcla de 1:4 etanol:aceite y se inyecta en las patas traseras del animal. A todos estos animales se les añadirá desde el inicio del experimento ClNa al 1% en el agua de bebida y a partir de la quinta semana KCl al 0,2% para evitar un aumento demasiado elevado de la presión arterial.

Estos animales se distribuyeron de la siguiente manera:

Grupo 1: Ratas SD control (n=7).

Grupo 2: Ratas DOCA (n=15).

Grupo 3: Ratas DOCA ovariectomizadas (DOCA-OVX). Para la realización de la ovariectomía bilateral se anestesiaron los animales con isofluorano. Tras una laparotomía media, se localizaron los ovarios para su exéresis previo pinzamiento, sección y ligadura del mesovárico (n=15).

Grupo 4: Ratas DOCA ovariectomizadas y tratadas con apocinina (DOCA-OVX+AP). Ratas tratadas con apocinina, un inhibidor de la actividad NADPH-oxidasa, añadida en una concentración de 1,5 mmol en el agua de bebida previo control de ingesta de agua (n=15).

Grupo 5: Ratas DOCA ovariectomizadas y sometidas a tratamiento estrogénico (DOCA-OVX+E). Este tratamiento se realizó por la implantación subcutánea de pelets de 1,5 mg de 17 β -estradiol y de liberación lenta durante 60 días (n=15).

Los protocolos experimentales se realizaron a las 10 semanas de la nefrectomía y de comenzar los tratamientos en los diversos grupos.

2.2. Modelo de hipertensión SHR

Se utilizaron ratas hembras SHR de 10 semanas de vida y se distribuyeron en los siguientes grupos:

Grupo 1: Ratas SHR intactas (n=15).

Grupo 2: Ratas SHR ovariectomizadas (SHR-OVX)(n=15).

Grupo 3: Ratas SHR tratadas con apocinina (SHR+AP) (n=15).

Grupo 4: Ratas SHR ovariectomizadas tratadas con apocinina (SHR-OVX+AP) (n=15).

Los protocolos experimentales se realizaron durante 8 semanas después de la ovariectomía.

3. MEDIDA DE LA PAS

En todas las ratas, tratadas o no, se estudió la evolución de la PAS en semanas alternas. Dicha presión se determinó mediante Pletismografía en la arteria de la cola (LE5002 Storage Pressure Meter, Letica Scientific Instruments, Barcelona, España). Antes de las determinaciones, las ratas se colocaron en una jaula térmica (LE5610, Letica) durante 15 minutos a 28°C para conseguir una dilatación sutil de la arteria que facilitara la medida, así como la tranquilidad del animal. A cada animal se le hicieron entre 5 y 6 medidas al día.

4. REMODELADO DE LOS VASOS MIOCÁRDICOS

4.1. Técnica quirúrgica

Las muestras se obtuvieron de animales anestesiados con una combinación de ketamina y pentotal administrada intramuscularmente. Bajo anestesia se rasuró el abdomen y el tórax. La PA previa de la rata se determinó en la arteria carótida mediante un transductor de presión conectado a un polígrafo (Lectomed Multi-Trace 2). La arteria carótida izquierda se canuló tras acceder al paquete vasculonervioso del cuello y disecar dicha arteria. A continuación, después de ligar distal y proximalmente la arteria, se realizó una pequeña incisión por la que se introdujeron 2 cm aproximadamente de un catéter de polietileno PE-90 adelgazado en el extremo para facilitar su inserción, y se suturó el catéter a la arteria con lino 4-0. Una vez obtenido un registro de la PA media, se obtuvo una muestra de plasma y posteriormente se realizó una laparotomía media para realizar la extracción del intestino delgado para disecar las arterias mesentéricas y del riñón para el análisis de actividad MDA y expresión de proteínas. Así mismo se realizó la extracción del útero para pesarlo posteriormente.

Después se realizó una toracotomía media y se mantuvieron separadas las costillas con un separador Weitlander. Se expuso el corazón y se procedió a la parada en diástole del mismo tras inyectar en el ventrículo izquierdo 1 ml de KCl 1M. En ese instante se rompió la aurícula derecha y se inició la perfusión retrógrada. Esta se realizó con una bomba de infusión Watson Marlon a través del

catéter colocado en la carótida, a un ritmo de infusión que mantuvo la perfusión aproximadamente a la PA media de la rata que medimos previamente.

Primero se infundió PBS (tampón fosfato) durante 5 minutos, pasando a continuación a formaldehído al 10% en solución salina durante 15 minutos. Los líquidos sobrantes, PBS o formaldehído, se eliminaron por un sistema de aspiración acoplado a un grifo. Cuando finalizó la perfusión se extrajo el corazón y se separó el ventrículo izquierdo del derecho, aurícula izquierda y grandes vasos. Posteriormente se introdujo el corazón en un frasco con formaldehído al 10% y se guardó en refrigeración durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se cambió la disolución de formaldehído por otra de cacodilato sódico 1M, que fue en la que se conservó hasta su inclusión en historresina. El ventrículo izquierdo se cortó en 8 secciones de aproximadamente 1 mm perpendiculares al eje base-vértice, de manera que se toman los cortes impares y son esas cuatro secciones alternativas las que se enviaron al Servicio de Apoyo a las Ciencias Experimentales (SACE) para su inclusión en historresina.

4.2. Técnica de inclusión en historresina.

Las secciones extraídas de las cubetas de transporte y embebidas en cacodilato sódico se sometieron al siguiente protocolo:

- Lavado con líquido lavador compuesto de cacodilato y sacarosa.
- Deshidratación de las muestras en alcoholes a concentraciones crecientes de 50%, 70%, 90% y 100% durante 30 minutos.
- Infiltración de las muestras con una solución compuesta de una parte de etanol al 95% y otra parte de solución de resina, que contiene 50 ml de resina básica con 0,5 gr de activador.
- Realización de cada bloque, para ello se utilizan 15 ml de solución de infiltración y 1 ml de endurecedor recién preparado. Se llena un poco el molde, se orienta la muestra, se etiqueta y se procede a terminar de rellenar el molde.
- Polimerización de los bloques a 4°C durante 14 horas.
- Corte de los bloques con un micrótopo modelo LEICA RM 2155 con cuchillas de carburo de tungsteno en secciones de 2 µm de grosor.

De cada bloque se obtuvieron 2 portas y en cada porta se colocan 3 secciones de la muestra obtenidas por el micrótopo. Uno de los portas se utilizó para el análisis del remodelado vascular y el otro para el análisis de la fibrosis perivascular.

4.3. Análisis de las alteraciones en la estructura de la túnica media.

La estructura de los vasos miocárdicos viene definida en la túnica media por el área de la pared del vaso y por la relación media/luz para que podamos describir qué tipo de alteración acontece. Para la descripción de estos dos parámetros, se agruparon los vasos según su diámetro externo en tres grupos, tal y como hemos desarrollado en trabajos previos de nuestro modelado experimental: vasos de diámetro externo comprendido entre 50 y 100 μm , vasos con diámetro comprendido entre 100 y 200 μm y vasos de diámetro superior a 200 μm .

Las secciones se tiñeron con azul de toluidina al 1% durante 30 segundos a 60°C y a continuación se montaron los portas con un cubre y se sellaron con DPX. El estudio se realizó a doble ciego. Los portas se observaron con un sistema de captura de imágenes formado por un microscopio (Olympus Word Precision Instruments, Sarasota EEUU) conectado a una cámara digital (Cool Snap, RS Photometrics, Roper Scientific Inc. Tucson, EEUU). De una de las tres secciones que contiene cada porta, se capturaron las imágenes y sólo se consideran como válidas las de los vasos cuya relación entre el diámetro mayor y menor es menor de 1,3, asegurándonos así que el corte es transversal al vaso y por tanto los grosores de la pared no resultan de la oblicuidad del corte. Se utilizaron los objetivos de 25x y 10x.

Las imágenes se analizaron con el programa Zeiss K300 3.0, con el que se estudian los perímetros externo e interno del vaso y los diámetros externo e interno (cuatro medidas de cada uno). Los parámetros determinados en cada vaso fueron los siguientes (Figura III.1):

- El perímetro externo del vaso que se dibuja manualmente con el ratón.
- El perímetro interno del vaso dibujado manualmente con el ratón.
- El diámetro externo y se obtiene el promedio de las cuatro medidas que se realizan.

- El diámetro interno calculándose el promedio de las cuatro medidas.

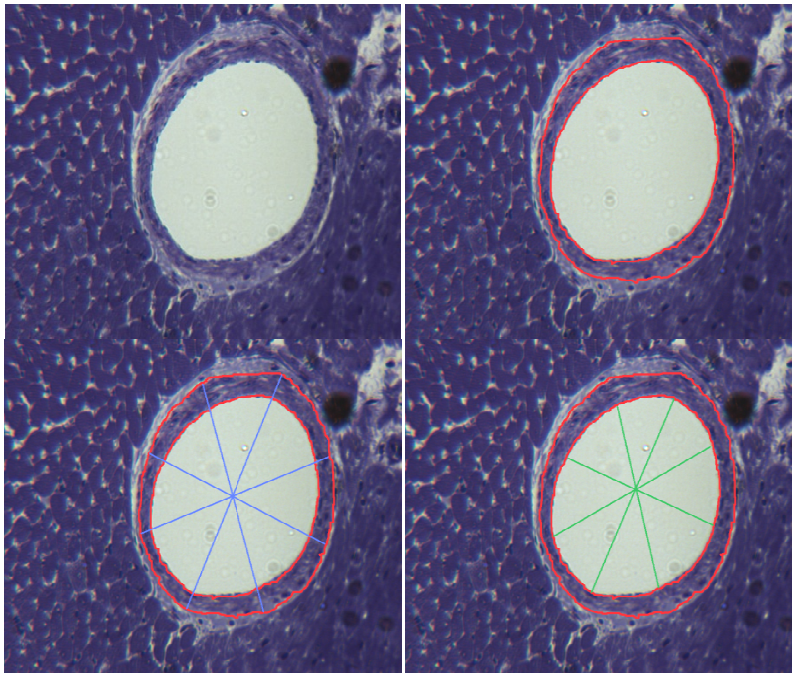


Figura III.1

Con estos datos el programa genera una hoja de cálculo con los siguientes parámetros:

- Área de la luz
- Área de la pared: Calculada restando del área total del vaso el área de la luz.
- Diámetro externo e interno.
- Grosor de la pared: Calculado por diferencia entre las medias del diámetro externo y del diámetro interno.
- Relación pared/luz: Cociente entre el grosor de la pared y el diámetro interno.

Los datos obtenidos se ordenaron según el diámetro externo y en sentido ascendente para clasificarlos en arteriolas de diámetro externo de 50-100 μm , en arterias de pequeño calibre de 100-200 μm , y en arterias de mediano calibre, 200 μm . Los vasos de diámetro inferior a 50 μm se descartan debido a la dificultad para medirlos con precisión.

Una vez clasificados los vasos e identificados los portas, se realizó la media aritmética de cada uno de los parámetros determinados y para cada tamaño de vasos de una misma rata. Estos datos se trasladan a otra hoja de cálculo donde se agrupan todas las ratas que pertenecen al mismo grupo.

4.4. Alteraciones en la estructura de la túnica adventicia. Análisis morfométrico de la fibrosis.

De entre las alteraciones de la capa adventicia, medimos el grado de fibrosis perivascular, y para ello se empleó una técnica de tinción específica para colágeno a base de pricosirio (0,2% de rojo sirio en ácido pícrico saturado y filtrado) según el siguiente procedimiento:

- Lavado de los portas con agua destilada.
- Tinción de las preparaciones. Debido a que la compactación de la historresina dificulta mucho la penetración del tinte, se debe usar calor como mordiente, para ello las preparaciones se ponen en cámaras húmedas sin tinte durante una hora a 60°C para permeabilizarlas. A continuación se sumergen durante 2 horas en el pricosirio a 60°C.
- Lavado de las muestras durante 10 minutos a 60°C en agua acidulada a pH 2 en agitación.
- Lavado de los portas con agua destilada a temperatura ambiente con el fin de eliminar el colorante sobrante.
- Tinción por inmersión con hematoxilina de Harris durante 1 minuto.
- Lavado con agua del grifo por inmersión hasta que el color rosa vira a morado.
- Lavado con agua destilada y, tras el secado, sellado con DPX y colocación de un cubre.

Para medir la fibrosis perivascular de una de las secciones de un porta se grabaron las imágenes de 10 vasos. Una vez grabados se analizaron con el programa Zeiss K300 a través de una plantilla de software o macro diseñado para tal fin y se midió el perímetro interno del vaso y el área de la fibrosis teñida con el pricosirio (Figura 2). Con estas medidas, el programa obtiene una hoja de cálculo que contiene el área vascular y el área de fibrosis perivascular. Esta información se

traslado a una hoja de cálculo para obtener el índice de fibrosis perivascular (IF), definido por el área de fibrosis perivascular con respecto al área de la luz de dicho vaso. Se identificaron los portas y, una vez agrupados los datos pertenecientes a una misma rata, se calculó el valor promedio. Los datos así obtenidos se trasladaron a otra hoja de cálculo donde se agruparon todas las ratas que pertenecían a un mismo grupo.

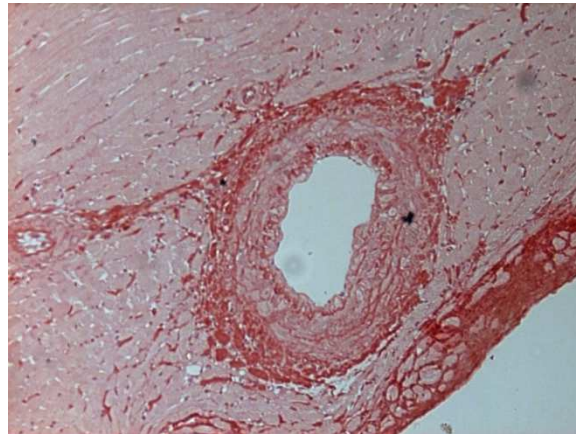


Figura III.2

5. MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR LA CUANTIFICACIÓN DE MDA (Malondialdehído) MEDIANTE TBARS.

El estrés oxidativo es causado por la presencia de cualquiera de una serie de especies reactivas del oxígeno (ROS), que la célula es incapaz de contrarrestar. El resultado es un daño a una o varias biomoléculas como el ADN, el ARN, proteínas y lípidos.

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien definido de daño celular en los animales y plantas. Los peróxidos lipídicos son indicadores inestables de estrés oxidativo en las células que se descomponen para formar compuestos más complejos y reactivos, como el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), bioproductos naturales de la peroxidación lipídica. La modificación oxidativa de los lípidos puede ser inducida in vitro por una amplia gama de agentes pro-oxidantes y se presenta in vivo durante el envejecimiento y en ciertas enfermedades. La medición de los productos finales de la peroxidación lipídica es uno de los ensayos más ampliamente aceptado para medir el daño oxidativo. Estos productos

aldehídicos secundarios de peroxidación de lípidos son generalmente aceptados como marcadores de estrés oxidativo.

La utilización de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un ensayo bien establecido para la detección y seguimiento de la peroxidación lipídica. El MDA forma un aducto 1:2 con el ácido tiobarbitúrico. El aducto MDA-TBA formado a partir de la reacción de la MDA en las muestras con TBA se puede medir colorimétricamente o fluorométricamente.

El ensayo TBARS proporciona la información pertinente sobre la actividad de los radicales libres y la medición de las características de muchos de los compuestos antioxidantes.

Este kit de medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico es una herramienta para la medición cuantitativa directa del MDA en muestras biológicas.

5.1. Preparación de las muestras

Para este ensayo se analizaron los riñones obtenidos de cada una de las ratas de los distintos grupos y las muestras de plasma. Todas las muestras deben ser analizadas inmediatamente o almacenarlas a -80°C . En el caso de los riñones debido a que la hemoglobina interfiere con el ensayo, la sangre debe ser retirada de la muestra de tejido por perfusión con PBS y heparina. Se suspenden de 50 a 10 mg/ml en PBS con antioxidante 1X BHT. A continuación hay que homogeneizar la muestra de tejido en hielo, centrifugar a 10000g durante 5 minutos y recoger el sobrenadante. En este sobrenadante se puede medir ya directamente los niveles de TBARS y los resultados pueden ser normalizados en función de su concentración de proteína.

En el caso de las muestras de plasma para minimizar la interferencia de la hemoglobina hay que preparar la muestra de plasma tan pronto como sea posible después de extraer la sangre. Se le añade 1X BHT a la muestra de plasma para evitar su posterior oxidación. Las muestras de plasma pueden ser analizadas directamente sin ningún tratamiento posterior.

5.2. Protocolo del análisis

- Preparar y mezclar bien todos los reactivos antes de su uso. Cada muestra de MDA y el estándar deben ser analizados por duplicado.

- Añadir 100 μl de las muestras a los tubos de microcentrífuga al igual que los estándar.

- Añadir 100 μl de la solución de lisis SDS tanto a las muestras como a lo estándar. Mezclar bien e incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 250 μl del reactivo TBA a cada muestra.

- Cerrar los tubos e incubar a 95°C durante 45-60 minutos.

- Enfriar los tubos a temperatura ambiente en hielo durante 5 minutos.

- Centrifugar todos los tubos a 3000 rpm durante 15 minutos. Eliminar el sobrenadante de las muestras para su posterior análisis.

- Medición espectrofotométrica: Se transfieren 200 μl de los estándar de MDA y las muestras a una microplaca de 96 pozos compatible con un lector de placas espectrofotométrico. Las muestras se leen a una absorbancia de 532 nm.

6. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA NADPH OXIDASA VASCULAR EN LECHO MESENTÉRICO

La quimioluminiscencia (QL) se define como la emisión de radiación electromagnética, normalmente en la región del visible o infrarrojo cercano, producida por una reacción química. Para que se dé la QL es necesario que la reacción produzca un exceso de energía, lo cual es bastante frecuente en reacciones redox. En nuestro caso medimos la formación de $\cdot\text{O}_2^-$ a partir de la NADPH oxidasa vascular en muestras de lecho mesentérico ultracongelado y machacado.

Los reactivos utilizados son:

- Solución Krebs-HEPES preparada a diario ajustada a pH 7,4.

- Lucigenina (Nitrato de bis-N-acridinio, Sigma-Aldrich, Alemania) 10⁻⁴ M en Krebs-HEPES preparada a diario y mantenida en la cámara a 37°C tapada de la luz.

- NADPH (Sigma-Aldrich Steinheim, Alemania).

Una de las ventajas más importantes de la QL como técnica analítica es la simplicidad de la instrumentación, que incluye como componentes principales un luminómetro (Luminoskam TL plus, Thermo Fisher Scientific, Nueva York), una pistola Hamilton (Hamilton et Co., Reno, Nevada) y un sistema de registro de datos, en nuestro caso, una impresora convencional.

En nuestro ensayo, el luminómetro se introdujo en una cámara térmica para mantenerlo a 37°C, así como también para controlar la temperatura interior en el compartimento de la mezcla de reactivo y la muestra, además del aislamiento de la luz externa.

Las muestras se machacaron con N₂ líquido y se dispusieron en tubos de medida previamente rotulados con el peso y se resuspendieron con 180 µl de Krebs-HEPES y 20 µl de inhibidor de proteasas. Se sonicaron manteniéndolos en hielo en 3 pulsos de 10 s cada uno, se les añadió 700 µl de Krebs-HEPES a 37 °C y se mantuvieron en el baño a 37°C durante 1 min. Se introdujeron los tubos en el luminómetro y se midió la producción de fondo de $\cdot\text{O}_2^-$ o background.

Se añadieron 50 µl de solución de lucigenina y se midió entonces el basal durante 5 min. Una vez transcurridos, se dispararon los 50 µl de NADPH y se midió la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ durante 5 min. En las técnicas de QL, una vez mezclados los reactivos y la muestra comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactantes se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión continua muy baja. En nuestro ensayo tomamos como periodo de captación 5 min porque a partir de los cuales se pierde la señal luminosa.

Posteriormente, se metieron los tubos en una estufa a 37°C durante toda la noche para que se deshidratasen y se pudiese medir el peso seco de la muestra por diferencia de peso del tubo con respecto al peso inicial. Los datos se presentaron por cuentas/min.mg tejido seco.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los grupos experimentales se ha presentado el valor medio \pm el error estándar de cada variable. Las diferencias en función del tiempo o del efecto de las drogas empleadas entre los valores medios de la presión arterial sistólica, dentro de un mismo grupo o de distintos grupos experimentales, se analizaron por un análisis de varianza doble para medidas repetidas, seguido de un test de Fisher. Las diferencias de valores medios del resto de variables estudiadas entre los distintos grupos experimentales se analizaron mediante un análisis de la varianza totalmente randomizado, seguido de un test de Fisher. La diferencia entre las medias de todas las variables estudiadas se considera estadísticamente significativa tras el análisis estadístico cuando, al menos, $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. Modelo de hipertensión DOCA

Para realizar este estudio hemos analizado en cada grupo la evolución de la PAS durante 10 semanas, la variación del peso corporal, el peso del útero, la participación del estrés oxidativo mediante la medición del MDA, la estructura de la pared de los vasos miocárdicos y el efecto de la apocinina sobre la presión arterial sistólica y el remodelado vascular.

1.1. Comparación del peso del útero entre DOCA y DOCA-OVX

Para comprobar que la ovariectomía había sido eficaz, al concluir los experimentos se diseccionaron los úteros de los animales y se pesaron (Figura IV.1). Como se puede comprobar en la gráfica existe una diferencia significativa ($P < 0,001$) entre el peso de los úteros de ratas DOCA ($349,91 \pm 19,26$ mgr) y ratas DOCA-OVX ($70,8 \pm 1,8$ mgr).

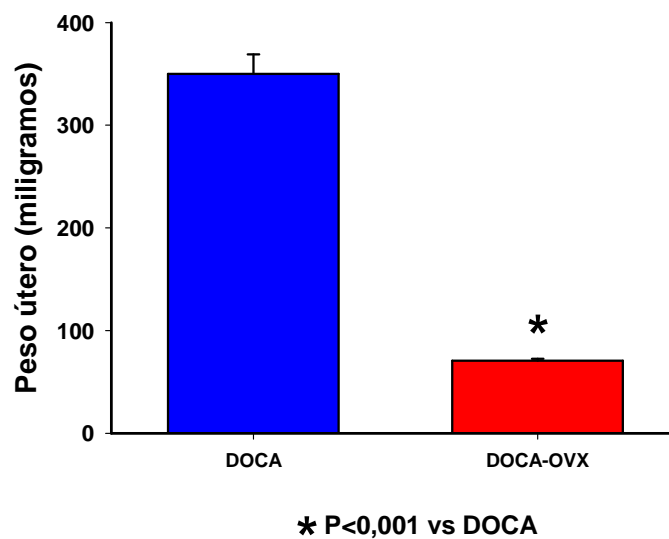
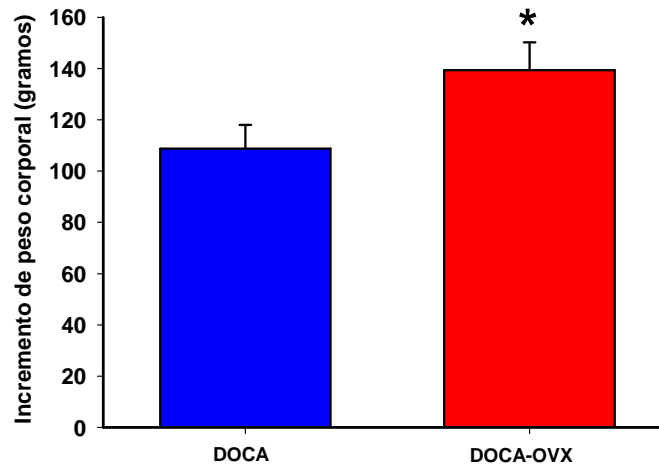


Figura IV.1. Representación gráfica de los valores medios del peso del útero y sus errores estándares de ratas DOCA (n=8) y DOCA-OVX (n=7).

1.2. Incremento del peso corporal de DOCA y DOCA-OVX

La ovariectomía produce una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el incremento de peso corporal de ratas DOCA y DOCA-OVX (Figura IV.2)

obteniendo un valor para los animales del grupo DOCA de $108,81 \pm 9,12$ gr y un incremento de peso de $139,36 \pm 10,98$ gr para los animales del grupo DOCA-OVX.



* $P < 0,05$ vs DOCA

Figura IV.2. Representación gráfica de los valores medios del incremento de los pesos corporales de ratas DOCA (n=11) y DOCA-OVX (n=10).

1.3. Niveles de Malondialdehido (MDA)

Al medir los valores de MDA mediante los TBARS en riñones de animales DOCA y DOCA-OVX se obtuvo un aumento significativo ($P < 0,05$) en estas últimas (Figura IV.3). Los valores obtenidos fueron de $3,30 \pm 0,85$ nmol/100 mgr de proteína para los animales del grupo DOCA y $6,08 \pm 0,62$ nmol/100 mgr de proteína para el grupo DOCA-OVX.

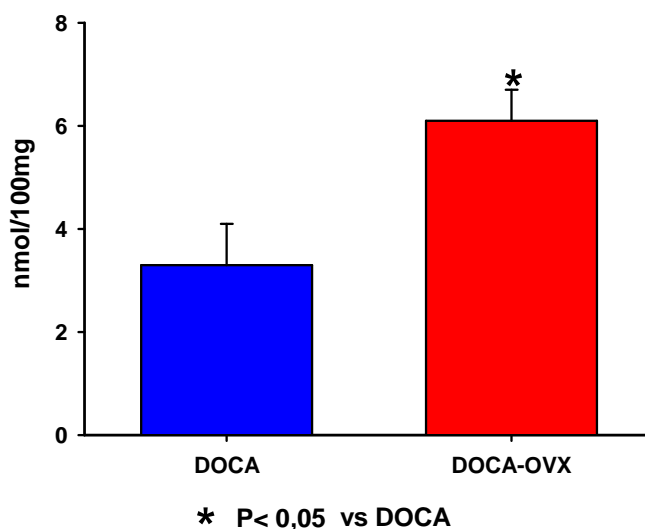


Figura IV.3. Representación gráfica de los valores medios del MDA y sus errores estándares en riñón de ratas DOCA (n=8) y DOCA-OVX (n=8) expresado en nmoles por 100 mgr de proteína.

No se obtuvieron resultados significativos al realizar este ensayo en las muestras de plasma al comparar ratas DOCA y DOCA-OVX, aunque si existieron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre estos dos grupos y un grupo de ratas hembras SD intactas (Figura IV.4).

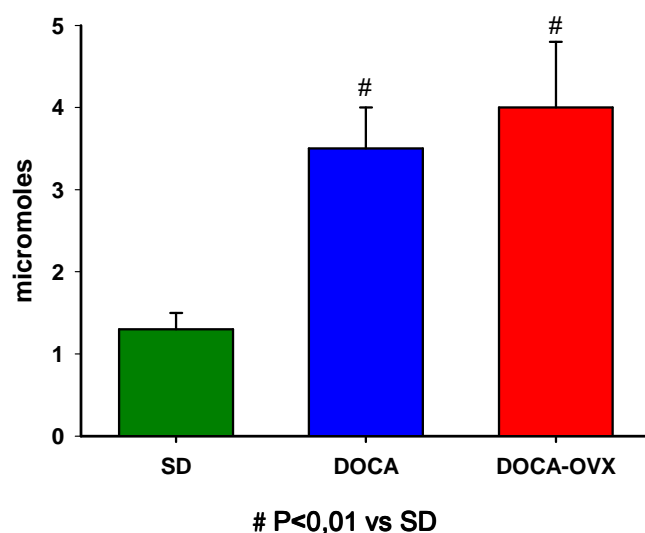


Figura IV.4. Representación gráfica de los valores medios del MDA y sus errores estándares en plasma de ratas DOCA (n=8), DOCA-OVX (n=8) y SD (n=7) expresado en micromoles.

1.4. Presión arterial sistólica (PAS)

Hemos estudiado la evolución de la PAS por medio de su medida quincenal a lo largo de 10 semanas de experimentación. Los valores basales para cada uno de los grupos fueron los siguientes: $112,8 \pm 2,97$ mm de Hg para el grupo de ratas hembra DOCA, $112,9 \pm 3,1$ mm de Hg para el grupo DOCA-OVX, $112,5 \pm 2,6$ mm de Hg para el grupo DOCA-OVX tratado con apocinina (DOCA-OVX+AP) y $116,8 \pm 2,5$ mm de Hg para el grupo de ratas DOCA-OVX tratadas con 17β -estradiol (DOCA-OVX+E).

Como podemos observar en la siguiente gráfica (Figura IV.5) la PAS en las ratas DOCA-OVX empieza a diferenciarse respecto a las DOCA desde la primera semana, llegando a alcanzar una diferencia de 30 mm de Hg en la última semana del tratamiento, con una PAS final para el grupo DOCA de $172,0 \pm 6,3$ mm de Hg y de $200,9 \pm 7,1$ mm de Hg para las ratas del grupo DOCA-OVX.

Las diferencias de la PAS entre animales DOCA y DOCA-OVX son significativas desde la tercera semana de experimentación.

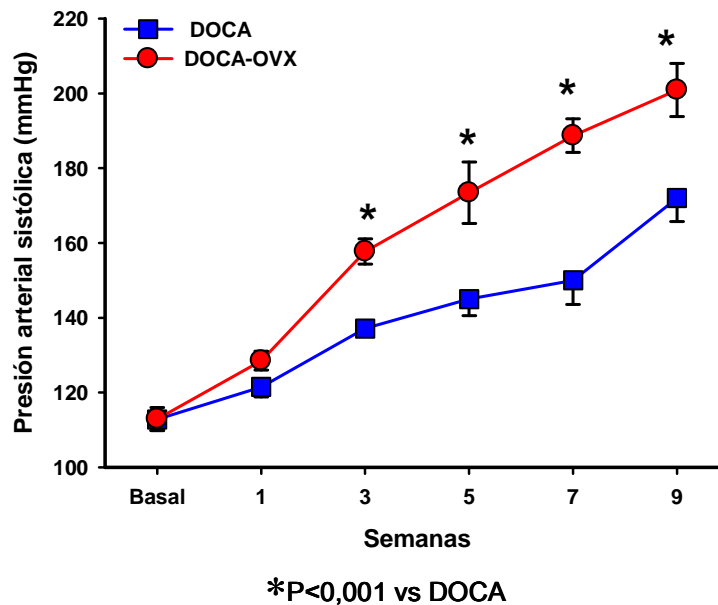


Figura IV.5. Representación gráfica de los valores medios y errores estándares de la PAS en los grupos DOCA (n=14), DOCA-OVX (n=12).

El tratamiento con apocinina (Figura IV.6) atenuó el incremento de la PAS presente en las ratas DOCA ovariectomizadas manifestando estos animales tratados con apocinina una PAS final de $176,4 \pm 3,1$ mm de Hg, llegando a alcanzar estos animales, tratados con apocinina, valores de PAS finales similares a los animales del grupo DOCA.

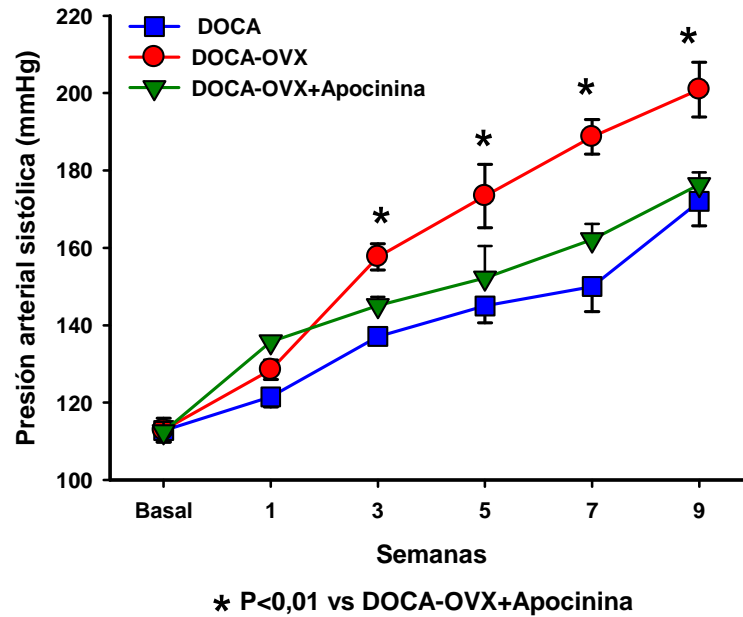


Figura IV.6. Representación gráfica de los valores medios y errores estándares de la PAS en los grupos DOCA (n=14), DOCA-OVX (n=12) y DOCA-OVX+AP (n=12).

El tratamiento con estradiol (Figura IV.7) también atenuó el incremento de la PAS sufrido por las ratas DOCA-OVX al igual que la apocinina, mostrando también diferencias significativas desde la tercera semana y alcanzando al final una PAS de $176,6 \pm 2,8$ mm de Hg similar a la de las ratas DOCA. Los valores de la PAS de las DOCA-OVX+E siguen una evolución prácticamente en paralelo a las ratas DOCA.

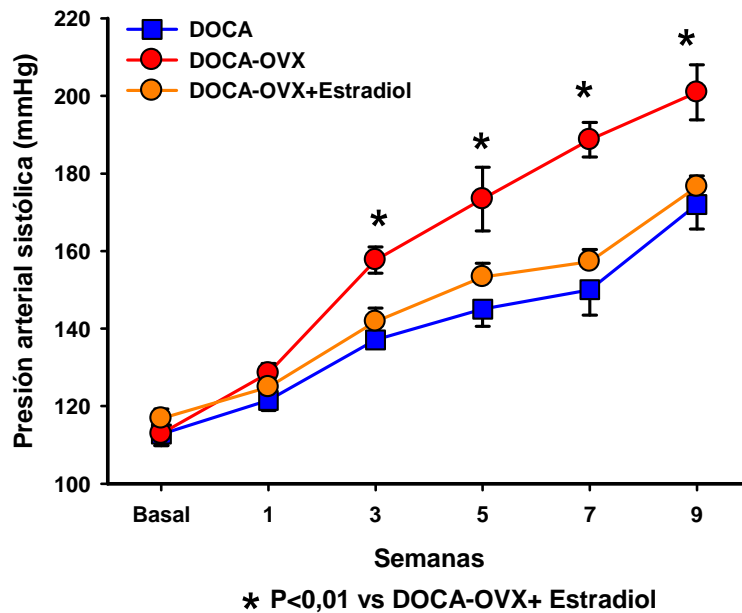


Figura IV.7. Representación gráfica de los valores medios y errores estándares de la PAS en los grupos DOCA (n=14), DOCA-OVX (n=12) y DOCA-OVX+E (n=11).

1.5. Estructura de la pared de los vasos miocárdicos

Para realizar este estudio analizamos las alteraciones presentes en la túnica media y en la túnica adventicia.

1.5.1. Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con apocinina

La caracterización del remodelado vascular se llevo a cabo mediante el estudio comparativo entre ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+AP.

En arteriolas miocárdicas de diámetro externo comprendido entre **50 y 100 μm** se obtuvieron los siguientes resultados:

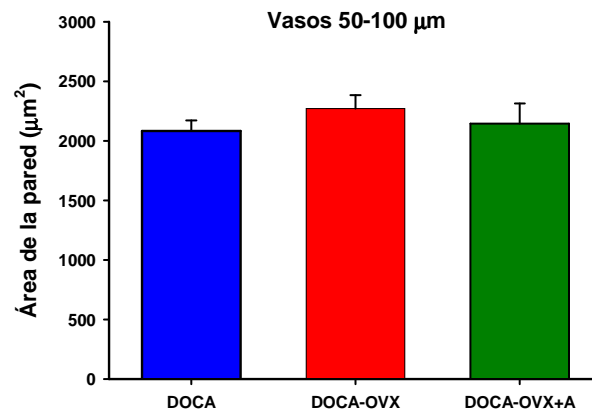


Figura IV.8. Representación gráfica de los valores medios del área de la pared y sus errores estándares en vasos miocárdicos de 50 a 100 µm de ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+AP (n=11).

En las arteriolas miocárdicas de este tamaño no se observan diferencias significativas en los valores del área de la pared (Figura IV.8) entre el grupo de ratas DOCA ($2083,15 \pm 89,81 \mu\text{m}^2$), ratas DOCA-OVX ($2271,67 \pm 111,98 \mu\text{m}^2$) y el grupo DOCA-OVX+AP ($2145,22 \pm 169,11 \mu\text{m}^2$).

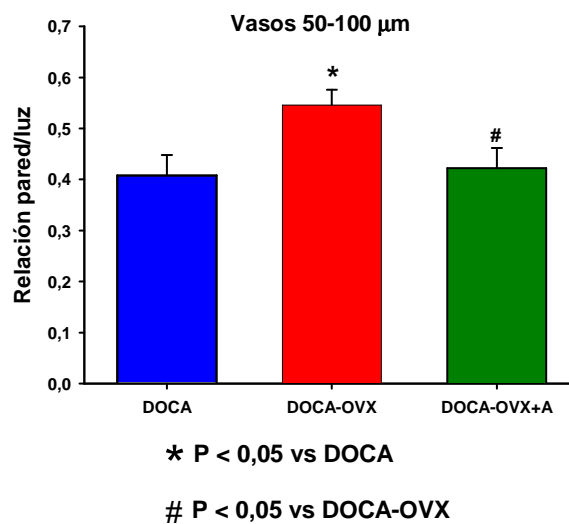


Figura IV.9. Representación gráfica de la relación pared/luz así como sus errores estándares en vasos miocárdicos de 50 a 100 µm de ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+AP (n=11).

En cambio sí que obtenemos diferencias en cuanto a la relación pared/luz (Figura IV.9). Tal y como se aprecia en el gráfico superior, existen diferencias

significativas ($P < 0,05$) en la relación pared/luz entre animales DOCA ($0,41 \pm 0,04$) y DOCA-OVX ($0,54 \pm 0,03$) y entre animales ovariectomizados y tratados con apocinina ($0,42 \pm 0,05$).

En los vasos de diámetro externo comprendido entre **100 y 200 μm** obtenemos resultados significativos tanto en los valores del área de la pared como en la relación pared/luz.

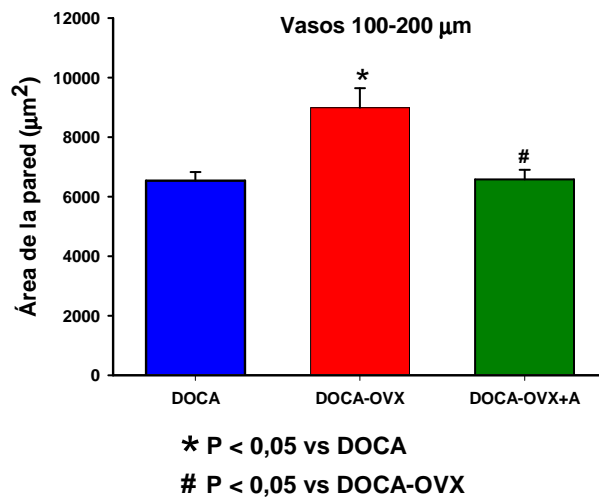


Figura IV.10. Representación gráfica de los valores medios del área de la pared con sus errores estándares en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm en ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+AP (n=11).

Al analizar los datos obtenidos para el área de la pared (Figura IV.10) se aprecia que al comparar el área de la pared de ratas DOCA ($6538,13 \pm 294,24 \mu\text{m}^2$) y DOCA-OVX ($8990,69 \pm 656,32 \mu\text{m}^2$) estas últimas presentan un aumento estadísticamente significativo para este dato ($P < 0,05$).

Por otro lado también se obtiene una disminución significativa ($P < 0,05$) del área de la pared de ratas DOCA-OVX+AP ($6581,23 \pm 318,41 \mu\text{m}^2$) respecto al área de las DOCA-OVX, alcanzando los animales tratados valores próximos a los animales DOCA.

Asimismo, obtuvimos diferencias significativas ($P < 0,05$) para la relación pared/luz (Figura IV.11) entre animales DOCA ($0,38 \pm 0,03$) y DOCA-OVX ($0,55 \pm 0,03$) y una disminución de la relación pared/luz de las ratas tratadas con apocinina ($0,37 \pm 0,02$) respecto de las ovariectomizadas.

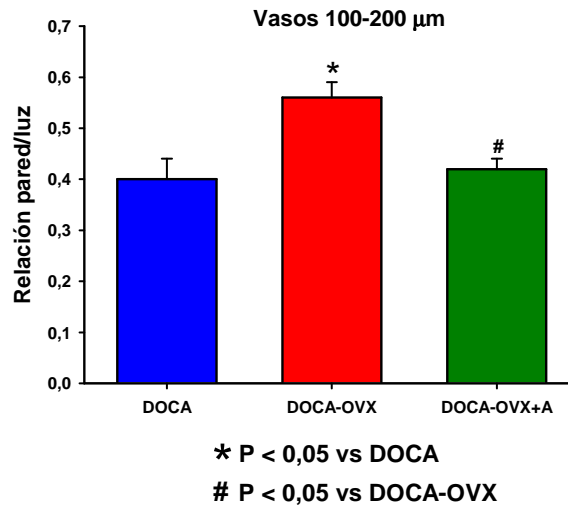


Figura IV.11. Representación gráfica de la relación pared/luz con sus errores estándares en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm en ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+AP (n=11).

En los vasos miocárdicos de diámetro externo superior a **200 μm** no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los dos parámetros estudiados tal y como se muestra en la siguientes gráficas.

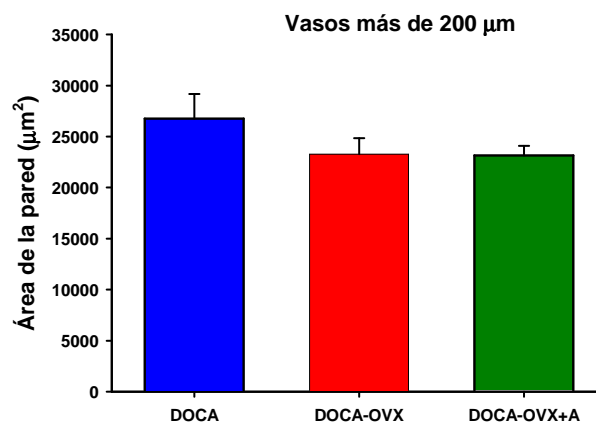


Figura IV.12. Representación gráfica de los valores medios del área de la pared con sus errores estándares en vasos miocárdicos con un diámetro superiores a 200 μm en ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+AP (n=11).

Para los animales pertenecientes al grupo DOCA se obtuvieron valores para el área de la pared de $26752,06 \pm 2411,73 \mu\text{m}^2$, en el grupo DOCA-OVX los valores fueron de $23281,56 \pm 1550,91 \mu\text{m}^2$ y en las tratadas con apocinina la media del área de la pared fue de $23142,18 \pm 938,26 \mu\text{m}^2$ (Figura IV.12).

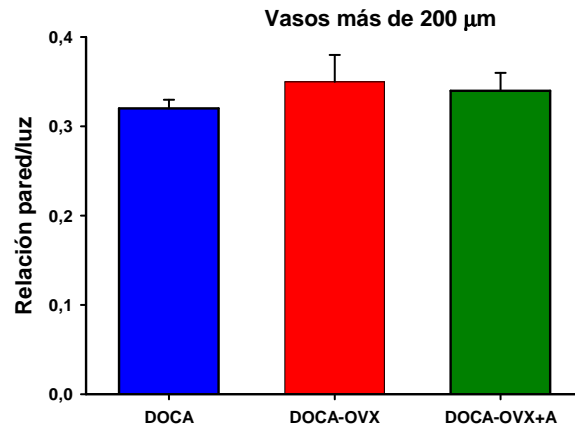


Figura IV.13. Representación gráfica de la relación pared/luz con sus errores estándares en vasos miocárdicos de diámetro externo superior a 200 μm en ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+AP (n=11).

Para la relación pared/ luz se obtuvo un valor medio de $0,32 \pm 0,02$ para los animales del grupo DOCA, $0,35 \pm 0,03$ para las DOCA-OVX y valores medios de $0,34 \pm 0,02$ para las DOCA-OVX+AP (Figura IV.13).

1.5.2. Alteraciones en la túnica media y efectos del estradiol

En el grupo de animales tratados con 17β -estradiol no se obtuvieron diferencias significativas en el valor del área de la pared en ninguno de los casos tal y como se muestra en la figura IV.14.

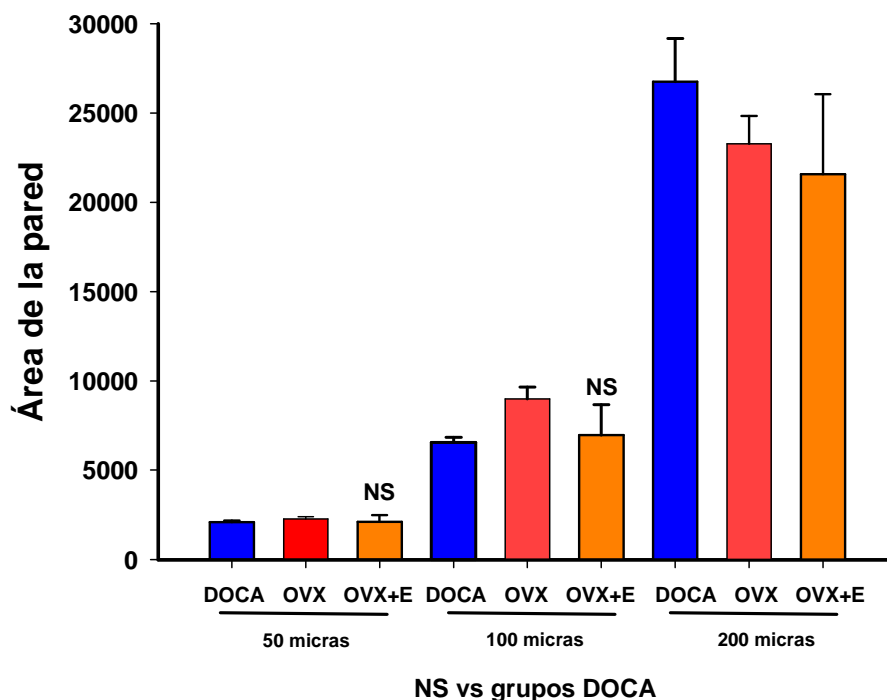


Figura IV.14 Representación gráfica de los valores medios del área de la pared con sus errores estándares en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm , de 100 a 200 μm y con un diámetro superior a 200 μm en ratas DOCA (n=9), DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+E (n=11).

En el grupo de animales tratados con 17β -estradiol (Figura IV.15) se obtuvo una reducción significativa ($P < 0,01$) en los valores de la relación pared/luz para los vasos miocárdicos de tamaño entre 50 y 100 μm con unos valores medios para la relación pared/luz de $0,40 \pm 0,03$ y para los vasos de diámetro externo comprendido entre 100 y 200 μm con una media de la relación pared/luz de $0,34 \pm 0,02$.

En los vasos miocárdicos de diámetro externo superior a 200 μm , el tratamiento con 17β -estradiol no produjo resultados significativos siendo los valores medios de la relación pared/luz para este grupo de $0,28 \pm 0,02$.

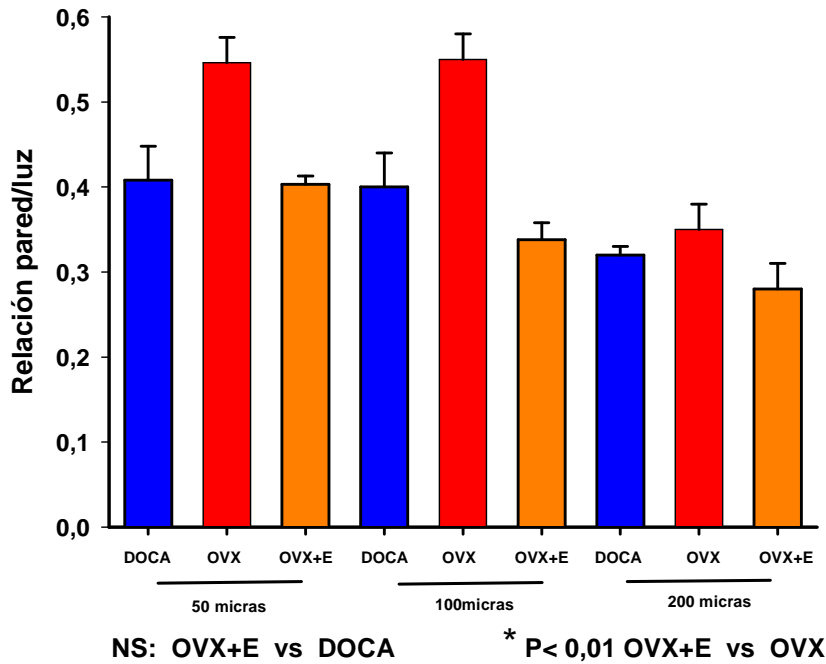


Figura IV.15. Representación gráfica de la relación pared/luz con sus errores estándares en vasos miocárdicos de diámetro externo superior entre 50 y 100 μm , 100 y 200 μm y más 200 μm en ratas DOCA-OVX (n=9) y DOCA-OVX+E (n=11).

1.5.3. Alteraciones de la túnica adventicia

El análisis de los datos (Figura IV.16) indica que los vasos miocárdicos en el grupo de hembras ovariectomizadas tratadas con apocinina ($0,34 \pm 0,04$) y en el grupo tratado con estradiol ($0,33 \pm 0,03$) desarrollan un grado de fibrosis significativamente menor que la fibrosis perivascular observada en los vasos de las ratas ovariectomizadas sin tratamiento ($0,61 \pm 0,01$), no siendo por tanto significativamente distinto de la fibrosis observada en los vasos del grupo de ratas intactas ($0,39 \pm 0,03$).

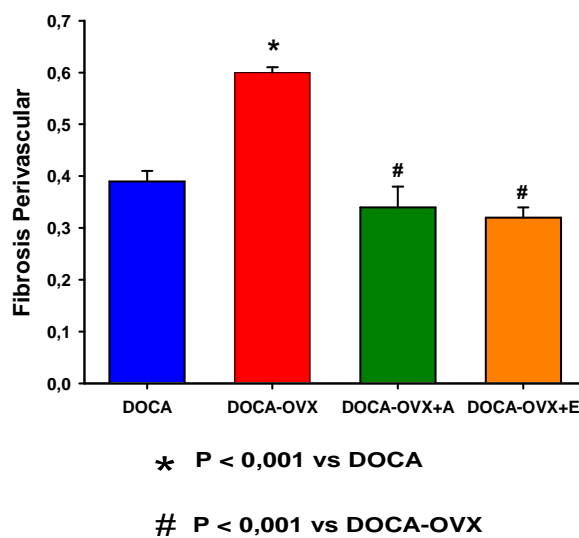


Figura IV.16. Representación gráfica de los valores medios del IF perivascular en los grupos de ratas DOCA (n=10), DOCA-OVX (n=8), DOCA-OVX+AP (n=8) y DOCA-OVX+E (n=6).

2. Modelo de hipertensión SHR

Para realizar este estudio utilizamos hembras SHR de 10 semanas y hemos analizado en cada grupo la evolución de la PAS durante 8 semanas, la variación del peso corporal, el peso del útero, la actividad NADPH-oxidasa, la estructura de la pared de los vasos miocárdicos y el efecto del tratamiento con apocinina.

2.1. Comparación del peso del útero entre SHR y SHR-OVX

Al igual que con los animales DOCA para comprobar que la ovariectomía había sido eficaz, al concluir los experimentos se extrajeron los úteros de los animales y se pesaron (Figura IV.17).

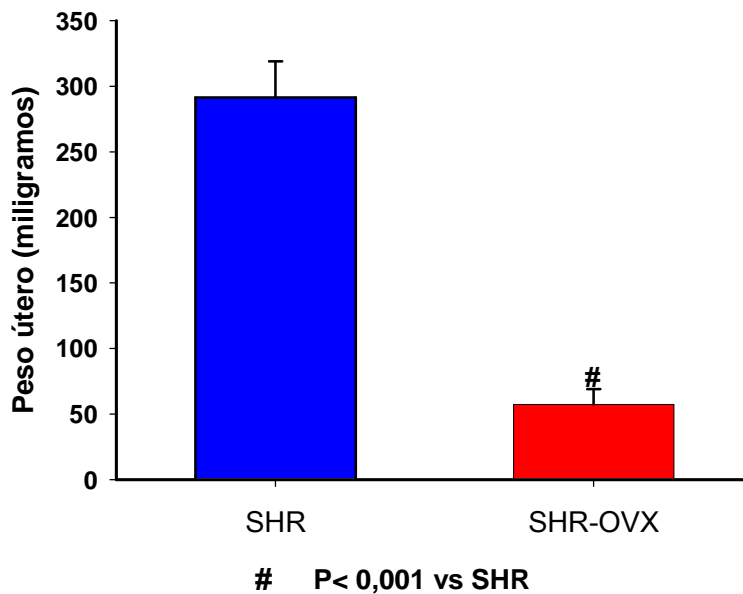


Figura IV.17. Representación gráfica de los valores medios del peso del útero y sus errores estándares de ratas SHR (n=5) y SHR-OVX (n=5).

Como se puede comprobar en la gráfica existe una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el peso de los úteros de ratas SHR ($291,42 \pm 27,57$ mgr) y ratas SHR-OVX ($57,28 \pm 11,86$ mgr).

2.2. Incremento del peso corporal de SHR y SHR-OVX

La ovariectomía produjo un aumento significativo ($P < 0,05$) del peso corporal de las SHR-OVX en comparación con las SHR intactas. Las SHR-OVX tuvieron un incremento medio de su peso de $82,83 \pm 10,76$ gr y las SHR aumentaron su peso en $45,13 \pm 8,91$ gr (Figura IV.18).

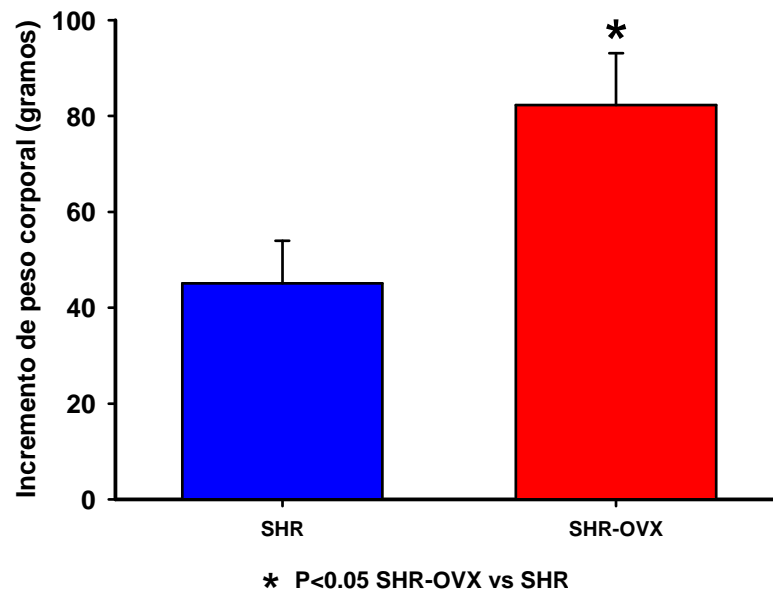
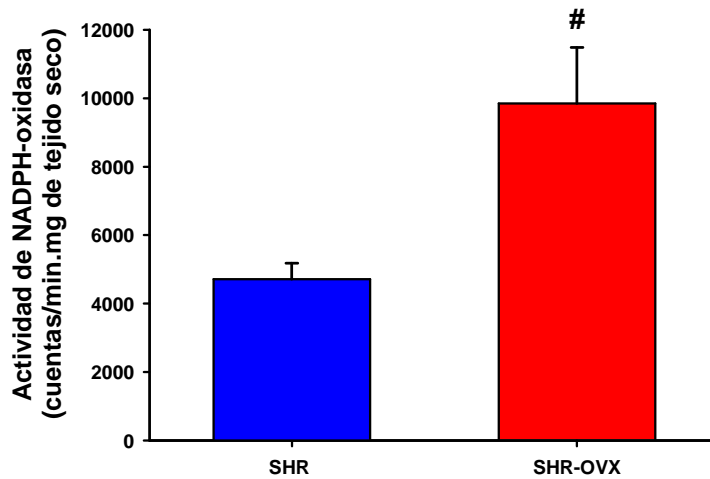


Figura IV.18. Representación gráfica de los valores medios de los incrementos de pesos corporales de ratas SHR (n=6) y SHR-OVX (n=6).

2.3. Actividad de la NADPH oxidasa vascular en lecho mesentérico.

La actividad máxima de la enzima NADPH oxidasa vascular de los vasos mesentéricos en el grupo de ratas ovariectomizadas tiene un valor mayor que en los vasos mesentéricos de ratas intactas siendo la diferencia significativa ($P < 0,05$). El valor numérico (Figura IV.19) nos da 4711 ± 468 cuentas/min.mg tejido seco en las SHR y 9847 ± 1635 cuentas/min.mg tejido seco en los vasos del lecho mesentérico de las SHR-OVX.



P<0,05 vs SHR

Figura IV.19. Actividad máxima de la enzima NADPH oxidasa vascular a partir de extracto de lecho mesentérico de ratas SHR (n=10) y SHR-OVX (n=13).

2.4. Presión arterial sistólica

En este grupo se estudió la evolución de la PAS a través de su medida periódica durante las 8 semanas de experimentación. Los valores basales obtenidos para cada uno de los grupos fueron de $155,28 \pm 2,84$ mm de Hg para las ratas SHR, $150,59 \pm 2,21$ mm de Hg para los animales SHR-OVX y por último presiones de $153,20 \pm 4,63$ mm de Hg para los animales tratados con apocinina SHR-OVX+AP.

Tal y como se representa en la gráfica (Figura IV.20) la PAS en las ratas SHR-OVX empieza a diferenciarse respecto a las intactas a partir de la segunda semana. En la última semana de experimentación se obtuvieron diferencias de 11 mm de Hg entre ambas. Los valores de la PAS final fueron de $163,68 \pm 1,29$ mm de Hg para el grupo SHR, $174,93 \pm 1,76$ mm de Hg para los animales SHR-OVX y $165,22 \pm 1,27$ mm de Hg para las SHR-OVX+AP (Figura IV.21)

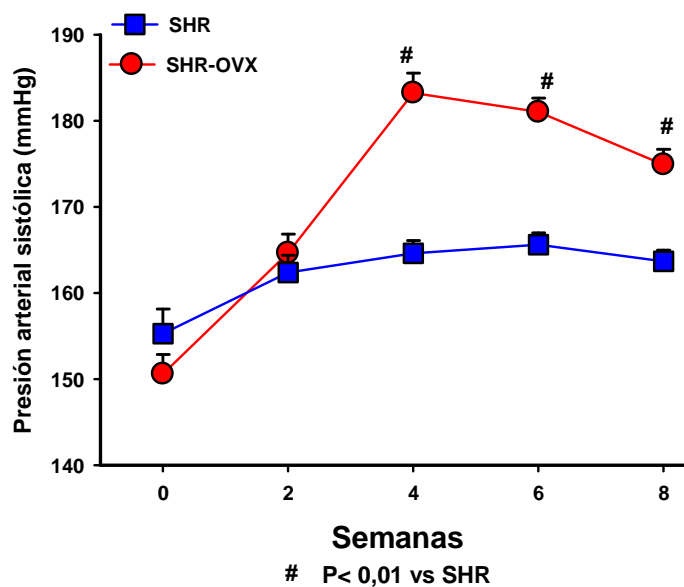


Figura IV.20. Representación gráfica de los valores medios y errores estándares de la PAS en los grupos SHR (n=12), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=11).

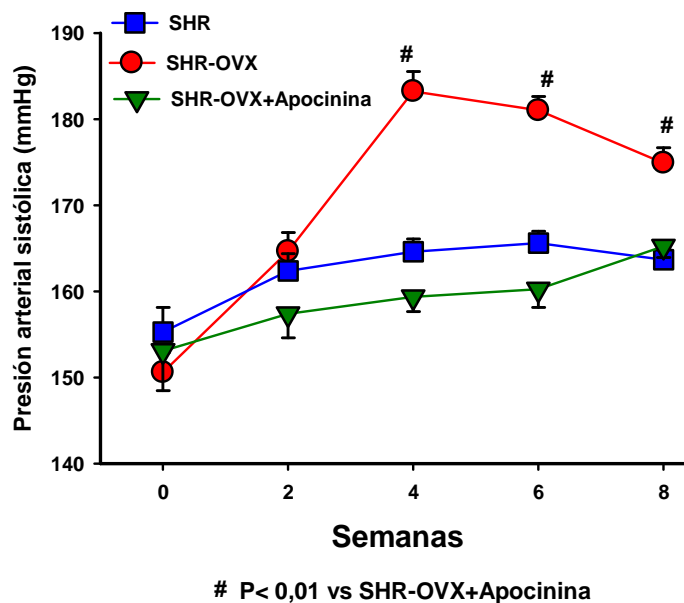


Figura IV.21. Representación gráfica de los valores medios y errores estándares de la PAS en los grupos SHR (n=12), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=11).

Los animales tratados con apocinina tuvieron una evolución de la PAS paralela a los animales SHR, estando sus valores por debajo de los valores medios de la PAS de las SHR (Figura IV.21).

2.5. Estructura de la pared de los vasos miocárdicos

En este estudio comparativo se midieron las alteraciones presentes en la túnica media y adventicia de los animales SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+AP.

2.5.1. Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con apocinina.

En arteriolas miocárdicas de diámetro externo comprendido entre 50 y 100 μm los resultados fueron los siguientes:

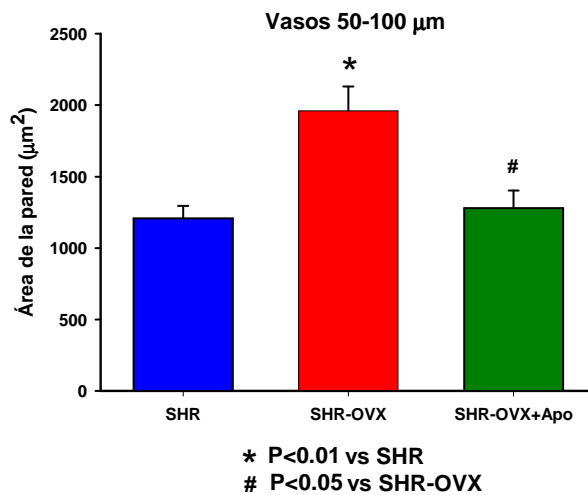


Figura IV.22. Representación gráfica de los valores medios del área de la pared y sus errores estándares en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm de ratas SHR (n=9), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=12)

En las arteriolas miocárdicas de este tamaño se observan aumentos significativos ($P < 0,01$) en los valores del área de la pared (Figura IV.22) entre ratas SHR (1208,19 \pm 86,49 μm^2) y ratas SHR-OVX (1961,35 \pm 169,05 μm^2). Así mismo se obtuvo una reducción significativa ($P < 0,05$) entre los animales tratados con apocinina (1280,54 \pm 121,30 μm^2) y los animales SHR-OVX.

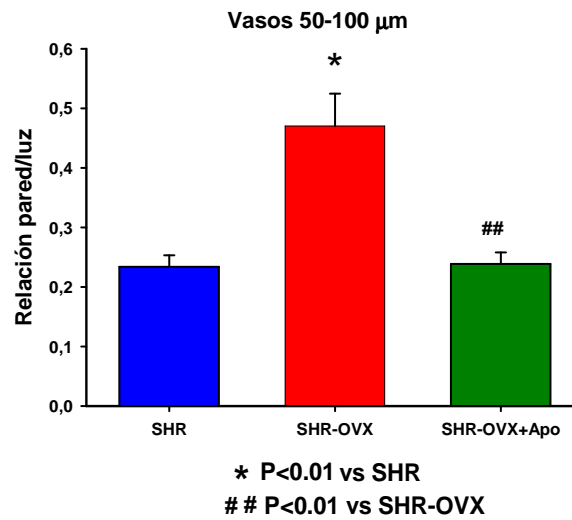


Figura IV.23. Representación gráfica de la relación pared/luz así como sus errores estándares en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm de ratas SHR (n=9), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=12).

Del mismo modo también se obtuvieron diferencias significativas (Figura IV.23) al comparar los valores de la relación pared/luz para los vasos de este tamaño.

Los animales del grupo SHR-OVX presentan un aumento significativo ($P<0,01$) de la relación pared/luz ($0,47 \pm 0,05$) con respecto a los animales del grupo SHR ($0,23 \pm 0,02$). También se obtuvieron diferencias significativas ($P<0,01$) entre las SHR-OVX y las SHR-OVX+AP ($0,24 \pm 0,02$).

En los vasos de diámetro externo comprendido entre **100 y 200 μm** obtenemos resultados significativos tanto en los valores del área de la pared como en la relación pared/luz.

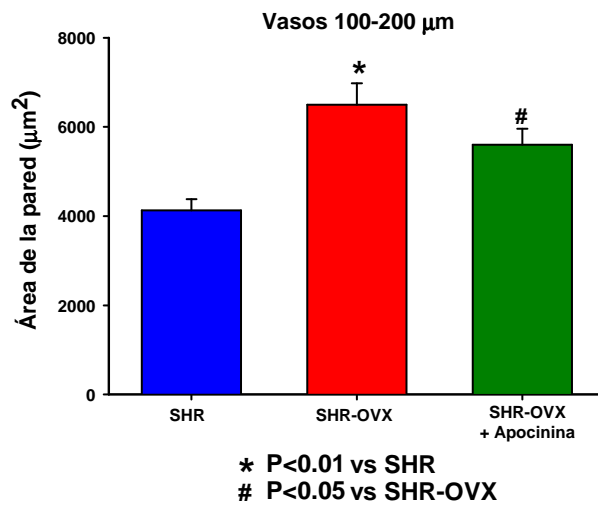


Figura IV.24. Representación gráfica de los valores medios del área de la pared con sus errores estándares en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm en ratas SHR (n=9), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=12).

Los animales del grupo SHR-OVX presentaron un aumento significativo ($P<0,01$) del área de la pared alcanzado un valor medio de $6500,85 \pm 480,99 \mu\text{m}^2$ con respecto a los animales del grupo SHR que tuvieron unos valores medios del área de la pared de $4132,09 \pm 251,35 \mu\text{m}^2$. El tratamiento con apocinina atenuó este aumento del área de la pared observado en los animales ovariectomizados ($P<0,05$) dando valores de $5603,71 \pm 358,33 \mu\text{m}^2$ (Figura IV.24).

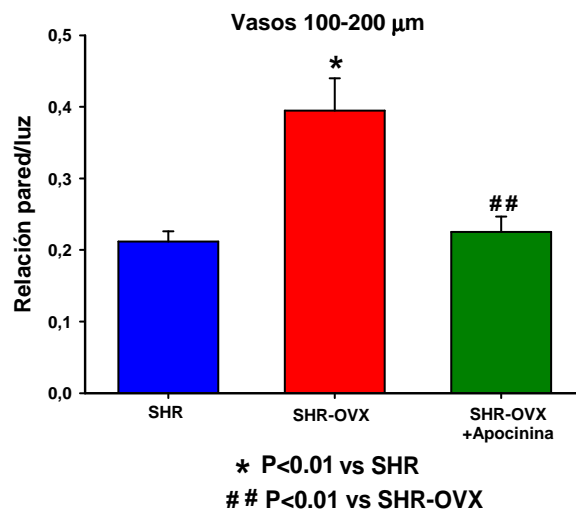


Figura IV.25. Representación gráfica de la relación pared/luz con sus errores estándares en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm en ratas SHR (n=9), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=12)

Asimismo, obtuvimos diferencias significativas ($P < 0,01$) para la relación pared/luz (Figura IV.25) entre animales SHR ($0,21 \pm 0,01$) y SHR-OVX ($0,38 \pm 0,04$) y una disminución significativa de la relación pared/luz de las ratas tratadas con apocinina ($0,22 \pm 0,02$) respecto de las ovariectomizadas.

En los vasos miocárdicos de diámetro externo superior a **200 μm** no se obtuvieron resultados relevantes para ninguno de los dos parámetros estudiados tal y como se muestra en la siguientes gráficas (Figuras IV.26 y IV.27).

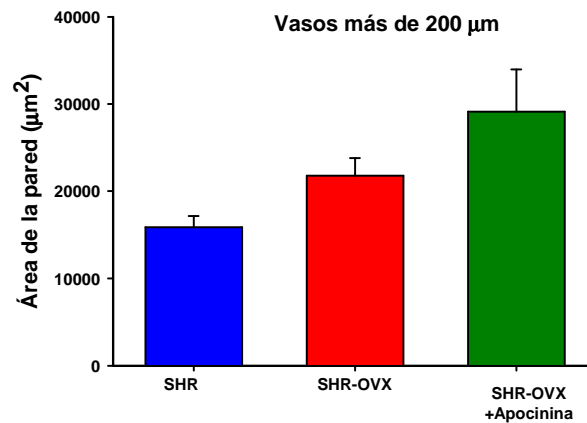


Figura IV.26. Representación gráfica de los valores medios del área de la pared con sus errores estándares en vasos miocárdicos con un diámetro superiorer a 200 μm en ratas SHR (n=9), SHR-OVX (n=11) y SHR-OVX+AP (n=12).

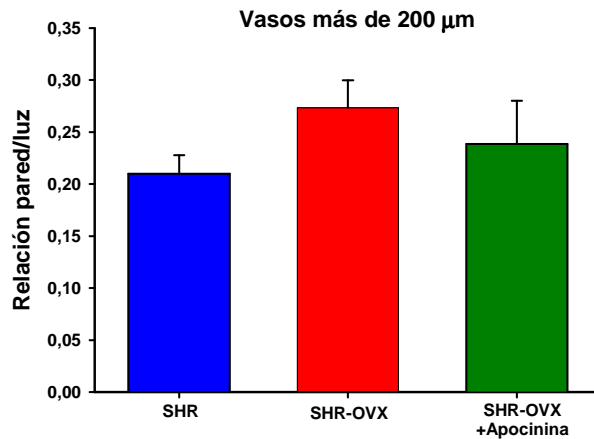


Figura IV.27. Representación gráfica de la relación pared/luz con sus errores estándares en vasos miocárdicos de diámetro externo superior a 200 μm en ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+AP.

2.5.2. Alteraciones de la túnica adventicia.

El análisis de los datos (Figura IV.28) indica que los vasos de los animales tratados con apocinina desarrollan un grado de fibrosis ($0,37 \pm 0,07$) significativamente menor ($P < 0,01$) que la fibrosis perivasculare presente en los animales del grupo SHR-OVX ($0,7 \pm 0,08$). También se observó un grado de fibrosis significativamente mayor ($P < 0,01$) entre los animales ovariectomizados y los pertenecientes al grupo SHR ($0,3 \pm 0,03$).

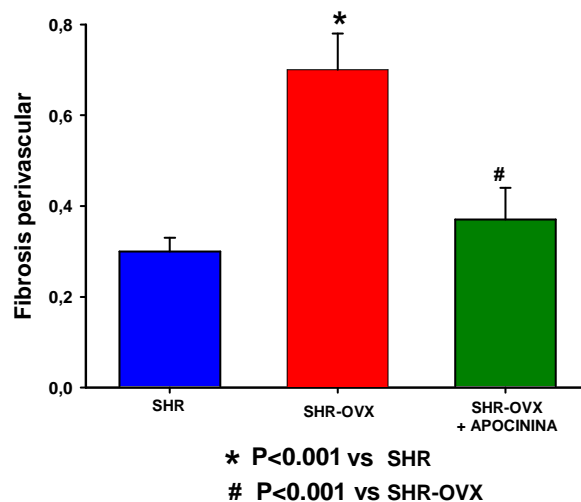


Figura IV.28. Representación gráfica de los valores medios del IF perivasculare en los grupos de ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+AP.

V. TABLAS

1. Modelo de hipertensión DOCA

1.1 Comparación del peso del útero entre DOCA y DOCA-OVX

Tabla V.1. Valores medios del peso del útero en miligramos y errores estándar en ratas DOCA y DOCA-OVX. * vs DOCA (P<0,001).

PESO ÚTERO	DOCA	DOCA-OVX
MEDIA	349,91	70,80*
ERROR ESTÁNDAR	19,26	1,80

1.2 Incremento del peso corporal de DOCA y DOCA-OVX

Tabla V.2. Valores medios del incremento de los pesos corporales en gramos y errores estándar en ratas DOCA y DOCA-OVX. * vs DOCA (P<0,05)

INCREMENTO PESO CORPORAL	DOCA	DOCA-OVX
MEDIA	108,81	139,36*
ERROR	9,12	10,98

1.3 Niveles de Malondialdehido (MDA)

Tabla V.3. Valores medios del MDA y sus errores estándar expresados en nmol/100 gr de proteína en riñones de ratas DOCA y DOCA-OVX. * vs DOCA (P<0,05).

MDA RIÑÓN	DOCA	DOCA-OVX
Media	3,30	6,08*
Error	0,85	0,62

Tabla V.4 Valores medios del MDA y sus errores estándar en plasma de ratas SD, DOCA y DOCA-OVX. * vs SD ($P < 0,01$).

MDA PLASMA	SD	DOCA	DOCA-OVX
Media	1,33	3,51*	4,02*
Error	0,36	1,02	1,52

1.4 Presión arterial sistólica.

Tabla V.5. Efecto de la ovariectomía y del tratamiento con apocinina y 17β -estradiol sobre la evolución de la presión arterial sistólica en ratas DOCA. * OVX vs DOCA ($P < 0,001$), # vs DOCA-OVX+Apocinina y DOCA-OVX+Estradiol ($P < 0,01$).

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA	Basal	Semana 1	Semana 3	Semana 5	Semana 7	Semana 9
DOCA	112,8 \pm 2,97	121,5 \pm 2,64	137,1 \pm 1,41	145 \pm 4,41	150,0 \pm 6,5	172 \pm 6,3
DOCA-OVX	112,9 \pm 3,1	128,5 \pm 2,5	157,7 \pm 3,4*#	173,4 \pm 8,2*#	188,7 \pm 4,5*#	200,9 \pm 7,1*#
DOCA-OVX+AP	112,5 \pm 2,6	135,7 \pm 0,9	145,1 \pm 2,2	152,2 \pm 8,3	162,1 \pm 4,1	176,4 \pm 3,1
DOCA-OVX+E	116,8 \pm 2,5	124,9 \pm 2,3	141,8 \pm 3,5	153,3 \pm 3,5	157,3 \pm 3,1	176,6 \pm 2,8

1.5 Estructura de la pared de los vasos miocárdicos.

1.5.1 Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con apocinina.

Tabla V.6. Valores medios del área de la pared y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 50 a 100 μ m de ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Apocinina.

ÁREA PARED	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP
Media	2083,15	2271,68	2145,23
Error	89,82	111,99	169,12

Tabla V.7. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm de ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Apocinina.

RELACIÓN PARED/LUZ	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP
Media	0,41	0,55	0,42
Error	0,04	0,03	0,05

Tabla V.8. Valores medios del área de la pared y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm de ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Apocinina. * vs DOCA ($P < 0,05$), # vs DOCA ($P < 0,05$).

ÁREA PARED	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP
Media	6538,14	8990,69*	6581,23#
Error	294,25	656,32	318,41

Tabla V.9. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm de ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Apocinina. * vs DOCA, # vs DOCA ($P < 0,05$).

RELACIÓN PARED/LUZ	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP
Media	0,39	0,55*	0,38#
Error	0,04	0,03	0,02

Tabla V.10. Valores medios del área de la pared con sus errores estándar en vasos miocárdicos de más de 200 μm en ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Apocinina.

ÁREA PARED	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP
Media	26752,07	23281,56	23142,18
Error	2411,73	1550,92	938,27

Tabla V.11. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de más de 200 μm en ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Apocinina.

RELACIÓN PARED/LUZ	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP
Media	0,32	0,35	0,34
Error	0,02	0,03	0,02

1.5.2. Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con estradiol.

Tabla V.11. Valores medios del área de la pared con sus errores estándar en ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Estradiol en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm , de 100 a 200 μm y mayores de 200 μm .

ÁREA DE LA PARED μm^2	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+E
50-100 μm	2083 \pm 90	2271 \pm 111	2095 \pm 383
100-200 μm	6538 \pm 294	8990 \pm 656	6966 \pm 1700
200 μm	26752 \pm 2411	23281 \pm 1550	21575 \pm 4480

Tabla V.12. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm , de 100 a 200 μm y mayores de 200 μm en ratas DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX+Estradiol. * vs DOCA-OVX ($P < 0,01$)

ÁREA DE LA PARED μm^2	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+E
50-100 μm	2083 \pm 90	2271 \pm 111	2095 \pm 383*
100-200 μm	6538 \pm 294	8990 \pm 656	6966 \pm 1700*
200 μm	26752 \pm 2411	23281 \pm 1550	21575 \pm 4480*

1.5.3 Alteraciones de la túnica adventicia

Tabla V.13. Valores medios del índice de fibrosis perivascular y sus errores estándar en ratas DOCA, DOCA-OVX, DOCA-OVX+Apocinina y DOCA-OVX+Estradiol. * vs DOCA ($P < 0,001$), # vs DOCA-OVX ($P < 0,001$).

IF PERIVASCULAR	DOCA	DOCA-OVX	DOCA-OVX+AP	DOCA-OVX+E
Media	0,39	0,60*	0,34#	0,33#
Error	0,03	0,01	0,04	0,03

2. Modelo de hipertensión SHR

2.1 Comparación del peso del útero entre SHR y SHR-OVX.

Tabla V.14. Valores medios del peso del útero en miligramos y errores estándar en ratas SHR y SHR-OVX. * vs SHR (P<0,001).

PESO ÚTERO	SHR	SHR-OVX
MEDIA	291,42	57,28*
ERROR	27,58	11,86

2.2 Incremento del peso corporal de SHR y SHR-OVX.

Tabla V.15. Valores medios del incremento de los pesos corporales en gramos y errores estándar en ratas SHR y SHR-OVX. * vs SHR (P<0,05)

INCREMENTO PESO CORPORAL	SHR	SHR-OVX
MEDIA	45,13	82,83*
ERROR	8,91	10,76

2.3 Actividad de la NADPH oxidasa vascular en el lecho mesentérico.

Tabla V.16. Valores medios y sus errores estándar de la actividad máxima de la enzima NADPH oxidasa vascular (cuentas/min.mgr de tejido seco) a partir de extracto de lecho mesentérico de ratas SHR y SHR-OVX. * vs SHR (P<0,05).

ACTIVIDAD NADPH OXIDASA	SHR	SHR-OVX
Media	4711	9847*
Error	468	1635

2.4 Presión arterial sistólica.

Tabla V.17. Efecto de la ovariectomía y del tratamiento con apocinina sobre la evolución de la presión arterial sistólica en ratas SHR. * vs SHR (P<0,01), # vs SHR-OVX+Apocinina (P<0,01).

PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA	Basal	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
SHR	155,28±2,85	162,37±2,03	164,62±1,48	165,62±1,38	163,68±1,29
SHR-OVX	150,59±2,29	164,64±2,21	183,24±2,29*#	181,01±1,61*#	174,93±1,76*#
SHR-OVX+AP	153,10±4,63	157,40±2,79	159,36±1,70	160,26±2,14	165,22±1,28

2.5 Estructura de la pared de los vasos miocárdicos.

2.5.1. Alteraciones en la túnica media y efecto del tratamiento con apocinina.

Tabla V.18. Valores medios del área de la pared y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm de ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina. * vs SHR (P<0,01), # vs SHR-OVX (P<0,05).

ÁREA PARED	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	1.208,19	1961,35*	1280,54#
Error	86,50	169,05	121,30

Tabla V.19. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 50 a 100 μm de ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina. * vs SHR ($P<0,01$), # vs SHR-OVX ($P<0,01$).

RELACIÓN PARED/LUZ	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	0,23	0,47*	0,24#
Error	0,02	0,05	0,02

Tabla V.20. Valores medios del área de la pared y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm de ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina. * vs SHR ($P<0,01$), # vs SHR-OVX ($P<0,05$).

ÁREA PARED	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	4132,10	6500,85*	5603,71#
Error	251,36	480,99	358,33

Tabla V.21. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de 100 a 200 μm de ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina. * vs SHR ($P<0,01$), # vs SHR-OVX ($P<0,01$).

RELACIÓN PARED/LUZ	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	0,21	0,39*	0,22#
Error	0,01	0,04	0,02

Tabla V.22. Valores medios del área de la pared con sus errores estándar en vasos miocárdicos de más de 200 μm en ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina.

ÁREA PARED	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	15867,23	21773,14	29137,90
Error	1274,58	2007,03	4836,69

Tabla V.23. Relación pared/luz y sus errores estándar en vasos miocárdicos de más de 200 μm en ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina.

RELACIÓN PARED/LUZ	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	0,21	0,27	0,24
Error	0,02	0,03	0,04

2.5.2. Alteraciones de la túnica adventicia.

Tabla V.24. Valores medios del índice de fibrosis perivascular y sus errores estándar en ratas SHR, SHR-OVX y SHR-OVX+Apocinina. * vs SHR ($P < 0,001$), # vs SHR-OVX ($P < 0,001$).

IF PERIVASCULAR	SHR	SHR-OVX	SHR-OVX+AP
Media	0,30	0,70*	0,37#
Error	0,03	0,08	0,07

VI. DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) tales como la hipertensión arterial y la enfermedad arterial coronaria son algunas de las enfermedades más comunes y costosas en los países industrializados. Aunque las mujeres están parcialmente protegidas de estas enfermedades antes de la menopausia, desarrollan rápidamente un aumento del riesgo cardiovascular después de la deprivación estrogénica. Al comparar ambos sexos, se ha comprobado que la incidencia de las ECVs es mayor en hombres con edad comprendida entre los 30 y los 50 años que en mujeres de la misma edad (Gerhard et al., 1995; Farhat et al., 1996). Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos muestran que las mujeres, que tienen una menor prevalencia de hipertensión antes de la menopausia muestran, a partir de esta, un significativo aumento de los niveles de tensión arterial (Isles et al., 1992). Estos y otros datos han dado lugar a la hipótesis de que las hormonas femeninas y especialmente los estrógenos, tienen un importante papel en la regulación de la presión sanguínea y en la génesis de la HTA en la mujer.

Los modelos de hipertensión esencial humanos y animales están asociados con hipertrofia e hiperplasia de las células musculares lisas vasculares, así como de remodelado cardíaco y de la pared arterial. Estos procesos cardiovasculares patológicos, asociados con la hipertensión, contribuyen al aumento de la resistencia periférica en los lechos vasculares y a las lesiones secundarias al proceso hipertensivo (Heagerty et al., 1993). Por tanto, además de los mecanismos neurales y humorales, los factores locales intrínsecos a la pared de los vasos son importantes contribuyentes en la regulación de la resistencia periférica.

Como ya adelantamos en la introducción, existen datos muy contradictorios sobre los efectos beneficiosos o perjudiciales que produce el THS. Últimamente se ha propuesto la “hipótesis del tiempo” que postula que las vías de señalización de los estrógenos se alteran en las mujeres mayores de tal manera que convierten efectos antiinflamatorios y vasoprotectores en efectos proinflamatorios y vasculotóxicos (Miller et al., 2003; Miller et al., 2005; Phillips et al., 2005). Por tanto, consideramos que son necesarios más estudios que definan los eventos celulares y moleculares en los que están involucrados los estrógenos y cómo estos interactúan con los procesos que protegen o dañan los vasos sanguíneos. Estos hallazgos podrían allanar el camino a nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de las enfermedades vasculares y de otros trastornos asociados a la menopausia como la osteoporosis, los sofocos o la resistencia a la insulina, entre otros.

Entre las ECVs en la mujer menopáusica, la hipertensión es un cuadro frecuente. No solo aumenta la incidencia de HTA en la menopausia, sino que esta es difícil de controlar con medicación. Sin embargo, como ya comentamos los mecanismos que subyacen a esta patología son parcialmente conocidos. En la fisiopatología de la HTA han sido implicadas hormonas vasoactivas, aumentos del tono simpático y recientemente el estrés oxidativo, Las ROS pueden alterar directamente la función vascular o producir modificaciones del tono vascular al disminuir la biodisponibilidad de NO. Estos y otros datos han llevado a sugerir que el aumento de estrés oxidativo y la disfunción endotelial que se observa en los enfermos hipertensos podría ser una de las causas de la HTA (Schulz et al 2011).

En el plasma de mujeres con ooforectomía bilateral se ha descrito un aumento de lipoperóxidos en plasma a los 15 días de la intervención y en mujeres posmenopáusicas aumenta el estrés oxidativo conforme lo hace el tiempo desde que se produjo la menopausia (Signorelli et al., 2001). Cabe por tanto señalar que existe una relación causal entre el aumento del estrés oxidativo y la hipertensión y entre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, que a menudo acompaña a la hipertensión. Por tanto, el aumento de la formación de ROS, mediada por un aumento de la actividad NADPH oxidasa, podría ser uno de los mecanismos envueltos en estos cambios. La THS puede proteger a las mujeres de la enfermedad cardiovascular, en parte, a través de la actividad antioxidante de los estrógenos. En este sentido, se ha demostrado que la administración de estrógenos reduce la presión sanguínea y previene el cambio en la estructura vascular miocárdica en animales SD y SHR ovariectomizados por prevención del estrés oxidativo (Hernández et al., 2000).

1. MODELO DE HIPERTENSIÓN DOCA-SAL

En nuestro trabajo hemos elegido el modelo de hipertensión DOCA-sal que es semejante a algunas de las formas que en el ser humano cursan con sensibilidad a la sal. Esta forma supone en el ser humano cerca de la mitad de todas las formas de hipertensión y se acompañan de enfermedad renal y de un aumento en la generación de ROS. Además, como comentamos en la introducción este modelo de hipertensión experimental, que comienza siendo una hipertensión dependiente del volumen circulante como consecuencia de la retención salina, termina siendo una hipertensión dependiente de otros mecanismos,

fundamentalmente un incremento de las resistencias vasculares, que se produce porque existen alteraciones e hiperactividad del sistema renina-angiotensina cerebral, activación de vasopresina, elevación de la actividad simpática y una mayor reactividad vascular (Ortiz et al., 2001). El aumento de los niveles plasmáticos y tisulares de la Endotelina-1 parece jugar un destacado papel (Schiffrin, 2005), que como luego discutiremos es, posiblemente junto a la privación de estrógenos, la responsable del aumento de ROS. En el modelo SHR la hipertensión está producida, desde su inicio, por un aumento de las resistencias vasculares debido a una mayor actividad simpática y del sistema renina-angiotensina. En este modelo ya hemos demostrado que la ovariectomía produce remodelado vascular (García et al., 2005) y que el 17 β -estradiol previene el estrés oxidativo producido por la ovariectomía (Hernández et al., 2000).

Al comienzo de nuestro estudio, tuvimos bastantes dificultades en la obtención del modelo de hipertensión DOCA. En los primeros ensayos utilizamos animales SD de 200 gr de peso a los que decidimos no nefrectomizarlos, como habitualmente se hace para producir hipertensión en este modelo, ya que pensamos que en caso de realizar la uninefrectomía se alcanzaría muy rápidamente (2-3 semanas) niveles de HTA maligna con una mortalidad muy alta, máxime si como hipotetizábamos la ovariectomía iba a producir un aumento de presión sobre los niveles alcanzados con el tratamiento con DOCA. Al cabo de 5 semanas de experimentación no se obtuvieron resultados positivos por lo que se decidió realizar en los siguientes grupos nefrectomía unilateral. Otro inconveniente para la obtención del modelo fue el peso del que partían los animales, ya que en estos animales de 200 gr de peso no se obtenían resultados significativos por lo que se decidió que el peso de partida de nuestros animales sería de 100 gr y así obtuvimos los resultados que se presentan.

Para comprobar que la ovariectomía había sido eficaz y que habíamos producido una deficiencia estrogénica, se les extrajo al finalizar la etapa experimental, a los animales DOCA y DOCA-OVX el útero. Como se observa en el apartado de resultados se obtuvieron diferencias significativas entre el peso de los úteros de animales DOCA y DOCA-OVX. Estos últimos presentaban úteros atrofiados posiblemente por la privación estrogénica. Obtuvimos resultados similares con el modelo de hipertensión SHR.

1.1. Efecto de la ovariectomía en el incremento de peso corporal.

El incremento de peso observado en los animales ovariectomizados fue significativamente mayor que en los animales DOCA, resultados similares se obtuvieron entre el modelo de hipertensión SHR y SHR-OVX.

Prácticamente en todos los estudios, la prevalencia de obesidad para todos los grupos de edad, es mayor en mujeres que en varones y aumenta según avanza esta, obteniéndose valores máximos alrededor de los 60 años. En el estudio SEEDO-97 la prevalencia de obesidad más elevada (33,7%) se encontró en el grupo de mujeres entre los 55 a los 60 años. Los datos de "The Women Health Initiative" en USA son similares. Se observó un índice de masa corporal (IMC>27) en el 44,6% de las más de las 90000 mujeres incluidas en este estudio con edades comprendidas entre 50 y 70 años (Pavón de Paz et al., 2006). En humanos, la influencia de las hormonas sexuales y especialmente los estrógenos en la ingesta de alimentos se hace ya evidente durante el ciclo menstrual: en la fase preovulatoria se han descrito una disminución de la ingesta que oscila entre el 50% al 250% de lo que se consume en la fase postovulatoria (Dalvit-McPhillipps, 1983).

La leptina es una proteína segregada en el tejido adiposo que informa al cerebro de la magnitud de las reservas energéticas. Para igual grado de adiposidad las mujeres tienen niveles más elevados de leptina que los hombres. Los estrógenos intervienen en la regulación de esta hormona estimulando su secreción y regulando la ingesta. En ratas se ha observado una disminución de los niveles de leptina tras la ovariectomía con el consiguiente aumento de peso. En mujeres en edad fértil los niveles circulantes de leptina son significativamente más elevados durante la fase lútea y su concentración declina tras la menopausia (Tommaselli et al., 2001).

Así pues, los estrógenos parecen intervenir en la regulación del apetito (Milewicz et al., 2001). La sensación de saciedad estimulada por la colecistoquinina (CCK) se ve aumentada por los estrógenos y existe una correlación positiva entre la CCK y los niveles de estos y un aumento de la CCK tras tratamiento hormonal sustitutivo. El descenso de los niveles estrogénicos también se ha asociado con una disminución de la actividad de péptidos opioides endógenos como la β -endorfina. Todas estas relaciones parecen indicar el efecto de la privación

estrogénica sobre la ingesta de grasas y carbohidratos en mujeres postmenopáusicas.

Otros estudios han demostrado que la obesidad se acelera después de la menopausia y a ella pueden contribuir la falta de estrógenos, el envejecimiento y los cambios que se producen en el estilo de vida. Los riesgos cardiovasculares que se producen por la obesidad dependen de la localización del tejido adiposo: la acumulación del mismo en la zona abdominal y visceral (patrón androide de obesidad) supone un mayor riesgo metabólico y cardíaco. En contraste, la distribución de la grasa en el tejido subcutáneo (patrón femenino) se relaciona pobremente con la aparición del síndrome metabólico. Pues bien, este patrón se modifica después de la menopausia y la mujer pasa del patrón femenino al masculino (Shi y Clegg, 2009). La lipoprotein lipasa (LPL) es una enzima determinante para la reserva intracelular de triglicéridos y su acción está influenciada por hormonas sexuales. Así los estrógenos y la progesterona estimulan la LPL en adipocitos de la región glúteo-femoral y en mujeres premenopáusicas su actividad en tejido adiposo femoral y glúteo es significativamente mayor que en grasa abdominal, determinando la tendencia al depósito graso ginoide. El cese en la secreción de estrógenos gonadales, con el consiguiente desbalance andrógenos/estrógenos, favorece el depósito graso abdominal con aumento de la grasa visceral (Milewicz et al., 2001). Los mecanismos por los que los estrógenos inhiben la ingesta en humanos parecen ser centrales: atraviesan la barrera hematoencefálica y activan los centros hipotalámicos de la saciedad inhibiendo la ingesta, el aumento de peso y los cambios en la distribución de la grasa que acabamos de describir.

En nuestros grupos experimentales la ovariectomía produce un significativo aumento de peso, aunque con los datos de nuestro estudio no podemos determinar los mecanismos que intervienen en este efecto de la privación de estrógenos.

1.2. Efecto de la ovariectomía sobre el aumento de la presión arterial.

Estudios realizados en nuestro departamento han podido constatar que la ovariectomía, en ratas SHR provoca un aumento de la PAS con respecto a las ratas SHR intactas, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística hasta la séptima semana después de la ovariectomía (García et al., 2005). Aunque

algunos autores no encuentran estos aumentos de presión después de la privación estrogénica en el modelo SHR (Fortepiani et al., 2003), otros si lo han demostrado en modelos de hipertensión sensibles a la sal como en ratas Dahl (Wren et al., 1981).

En nuestro trabajo realizado con animales DOCA-sal la PAS en DOCA-OVX se incrementó significativamente con respecto a las DOCA desde la tercera semana de experimentación alcanzando una diferencia de 30 mm de Hg en la última semana. Previos estudios habían demostrado cómo se produce, en el modelo DOCA-sal, la rápida elevación de la presión arterial (Karam et al., 1996; Crofton et al., 1997; Matsumura et al., 1999). Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan medido los cambios inducidos en la PAS por la ovariectomía en el modelo DOCA-sal y sólo el artículo de Shenoy y colaboradores en 2007 refiere cómo la ovariectomía incrementa la presión en este modelo.

Entre los principales mecanismos fisiopatológicos implicados en el origen y mantenimiento de la hipertensión DOCA-sal están los efectos centrales del CINA que determinarían un incremento del tono simpático sobre el sistema vascular. Por otro lado, varias hormonas vasoactivas han sido implicadas en la fisiopatología de este modelo, en un principio fue la vasopresina, pero posteriormente existen múltiples pruebas de que esta hipertensión es dependiente de una activación del sistema de la endotelinas (Schiffrin 2007). Por otro lado, la ausencia de estrógenos que supone la ovariectomía agrava la hipertensión. En efecto, la síntesis y actividad biológica de la ET-1 está regulada por los estrógenos, como lo sugiere el hecho de que el 17 β -estradiol disminuye la vasoconstricción inducida por la ET-1 en arterias coronarias tanto in vitro como in vivo. Además, en células endoteliales de aortas porcinas y en ausencia de hormonas ováricas femeninas se ha observado un incremento de la expresión de ARNm de preproendotelina y aumento de la liberación de ET-1. Junto a este dato se ha visto que tanto el estradiol como sus metabolitos 2-hidroxiestradiol y 2-metoxiestradiol inhiben la síntesis basal de ET-1 en las células endoteliales en arterias coronarias porcinas, posiblemente por un mecanismo independiente de los ERs (Dubey et al., 2001).

En estudios de corte realizados en humanos se ha demostrado un aumento de la PAS y PAD tras el inicio de la menopausia. Así diversos investigadores (Staessen et al., 1994) han demostrado un incremento cuatro veces superior en la

incidencia de la hipertensión en mujeres postmenopáusicas con respecto a mujeres premenopáusicas. Por otro lado, se ha observado, en humanos, que las variaciones en los niveles de estrógenos se asocian con cambios en la tensión arterial (TA): así durante el ciclo menstrual la TA es más baja durante la fase lútea que durante la fase folicular, momento del ciclo en el cual los niveles de estrógenos son menores, por lo que si los estrógenos endógenos bajan la presión arterial, la administración de preparados de estrógenos también podrían disminuir la presión arterial. De acuerdo con nuestros resultados cabría plantearse la hipótesis que en el aumento de presión arterial descrito en la mujeres menopáusicas podría contribuir un aumento de ET-1 o un incremento de la sensibilidad a dicha hormona.

En trabajos realizados anteriormente en nuestro departamento (García et al., 2005) el aporte exógeno de 17β -estradiol a las ratas SHR ovariectomizadas provocó un descenso en la PAS, pero dicho descenso solo fue significativo en la 13^a a 18^a semana con respecto a la semana 11 de estudios. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo en varios modelos animales de hipertensión en los cuales el estradiol también disminuye la presión arterial (Raghvendra et al., 2002). También en nuestro modelo de hipertensión DOCA-sal, el tratamiento con estradiol atenuó el incremento de la PAS observado en las ratas ovariectomizadas, mostrando también diferencias significativas desde la tercera semana de experimentación y siguiendo una evolución en paralelo con los animales DOCA. Lo cual nos lleva a la conclusión que es la falta de estrógenos lo que determina el aumento de PAS en nuestros animales DOCA-OVX

Finalmente y en apoyo de todo lo anterior tenemos que en el desarrollo de la hipertensión en el modelo DOCA-sal aparece dimorfismo sexual. En este modelo la presión arterial se eleva más rápido y a un nivel más alto en machos que en hembras (Ouchi et al., 1987) y la gonadectomía atenúa el desarrollo de la hipertensión en ratas macho y se agrava en ratas hembra (Crofton et al., 1989) lo cual sugiere, tal y como hemos podido comprobar en nuestro modelo, que las hormonas gonadales esteroideas afectan el desarrollo de la hipertensión en este modelo. Crofton y colaboradores (Crofton et al., 1994) observaron que en el modelo DOCA-sal los efectos de la gonadectomía se revertieron por el tratamiento de los machos con testosterona y de las hembras con estradiol. Además el tratamiento crónico de machos DOCA-sal con estradiol retardó el desarrollo de la hipertensión.

1.3. Efecto de la ovariectomía sobre el estrés oxidativo.

Los peróxidos lipídicos son indicadores de estrés oxidativo en la célula y se descomponen en moléculas como el malondialdehído (MDA). La valoración de la peroxidación se realiza cuantificando los TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) que forman complejos con el MDA.

En nuestros resultados, la cuantificación en plasma de MDA no muestran diferencias significativas entre los valores en animales DOCA y DOCA-OVX, aunque estos dos grupos si presentan valores de malondialdehído significativamente mayores que los determinados en un grupo de ratas SD normotensas. A la vista de estos resultados caben dos interpretaciones: el incremento de MDA en el grupo DOCA es ya tan alto que no se incrementa hasta valores significativos en el grupo DOCA-OVX. Otra posible interpretación es que los valores en plasma de MDA no reflejen el grado de peroxidación que se produce a nivel celular. Por ello, realizamos una valoración de los niveles de MDA en tejido renal y demostramos que la ovariectomía aumenta sus niveles. Los resultados correspondientes a los grupos SD y DOCA, tanto en plasma como en riñón coinciden con los publicados previamente por Galisteo et al. 2004. Todo ello parece indicar un aumento del estrés oxidativo que se manifiesta a nivel renal, órgano que en los casos de hipertensión sal-dependiente muestra signos de inflamación, aumentos de estrés oxidativo e insuficiencia (Manning et al., 2005). Otros trabajos han demostrado que los estrógenos protegen a la célula vascular a través de sus efectos antioxidantes inhibiendo la peroxidación lipídica (Yen et al., 2001).

En nuestro modelo de hipertensión DOCA-sal se han descrito aumentos del estrés oxidativo desde el año 2000 cuando Sommers y colaboradores (Sommers et al., 2000) demostraron que en este modelo, con niveles de renina baja se produce un elevado incremento de los niveles del radical superóxido. En estudios realizados por Beswick y colaboradores (Beswick et al., 2001) mostraron que los animales DOCA-sal tenían aumentada la producción de anión superóxido por un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa y que el tratamiento con antioxidantes e inhibidores de la NADPH oxidasa normalizaba su producción y atenuaba la PAS debido en parte a un aumento de la biodisponibilidad de NO.

Posteriormente se ha demostrado (Shiffrin 2005) que en este modelo el mecanismo fisiopatológico es dependiente de ET-1 y que esta media los aumentos de estrés oxidativo estimulando a la NADPH-oxidasa. El uso de antagonistas del receptor de endotelina redujo la presión sanguínea y la producción de ROS. Efecto que fue posteriormente comprobado por los estudios realizados por Callera y colaboradores (Callera et al., 2006) quienes constatan el papel de la ET-1 en el aumento de la producción de ROS a través de los receptores ET_A en el modelo de hipertensión DOCA-sal. Recientemente se han establecido los mecanismos por los que a nivel de membrana la ovariectomía produce aumento de ROS en un modelo de rata hipertensa sal dependiente. La ovariectomía incrementa la producción de superóxido, la expresión de la subunidad p22phox de la NADPH-oxidasa y disminuye los niveles de los enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Zhang et al., 2007). Por otro lado, el tratamiento con estrógenos en animales hipertensos y ovariectomizados disminuye la actividad de NADPH oxidasa y esta disminución de actividad se acompaña de una disminución de la expresión de p22(phox) (Sullivan et al. 2009).

En los trabajos realizados por Flavia y colaboradores (Flavia et al., 2001) observaron una activación diferente de la ruta de la ET-1 en machos y hembras DOCA-sal, en las que los machos presentaban marcadas alteraciones en respuesta a la ET-1 y a agonistas del receptor ET_B e hipotetizaron que las hormonas ováricas atenuaban las respuestas vasculares de los receptores ET_B. En base a sus resultados la ovariectomía en ratas hipertensas DOCA-sal y, en consecuencia, la reducción significativa en los niveles de estrógenos y progesterona empeoraron los efectos observados inducidos por la ET-1 aumentando los niveles de esta y de la expresión del ARNm del receptor ET_B. La restauración de los niveles de estrógenos y progesterona revirtieron estos cambios, reduciendo la HTA. En estudios más recientes (Gadner et al., 2010) el tratamiento con estrógenos en ratas macho reduce el estrés oxidativo y los niveles circulantes de ET-1.

1.4. Efecto de la apocinina sobre los aumentos de presión arterial en DOCA-OVX.

Como ya hemos mencionado anteriormente en el modelo de hipertensión DOCA-sal se produce un aumento de la producción de superóxido posiblemente mediado por un aumento de actividad de NADPH oxidasa y acompañado de

aumentos PAS. En efecto como ya demostró Beswick y colaboradores (Beswick et al. 2001) el tratamiento con apocinina, que actúa como inhibidor de la NADPH oxidasa, atenuó el aumento de la PAS.

En el presente trabajo hemos tratado a nuestros animales DOCA-OVX con apocinina, obteniendo un descenso significativo de la PAS desde las primeras semanas de experimentación y llegando en las últimas a una PAS similar a la encontrada en los animales DOCA no ovariectomizados. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que demuestra que en el modelo DOCA la privación de estrógenos agrava la hipertensión y que este aumento de presión se corrige con el tratamiento crónico con apocinina.

La apocinina por sus efectos inhibidores sobre la NADPH oxidasa disminuye los efectos de los ROS sobre los aumentos de presión, bien de forma directa ya que el estrés oxidativo produce aumentos de presión o porque modifica la estructura vascular. En el modelo de hipertensión SHR se ha demostrado que existe un aumento de la actividad NADPH oxidasa y de la producción de anión superóxido en aorta y mesentéricas desarrollando HTA. Además el desarrollo de la HTA se relaciona con una disminución de la biodisponibilidad de NO debido al superóxido. El tratamiento con inhibidores de la NADPH oxidasa disminuye la producción vascular de superóxido y atenúa el desarrollo de la hipertensión (Touyz, 2004). Las ROS funcionan como segundos mensajeros activando numerosas moléculas de señalización como las tirosinas quinasas, tirosina fosfatasas, MAP quinasas y canales de iones, principalmente a través de la oxidación y modificación de proteínas y de la activación de determinados factores de transcripción. Estas moléculas de señalización desempeñan un importante papel en la patología vascular. El estrés oxidativo contribuye al daño vascular por sus efectos sobre el crecimiento celular, la deposición de proteínas de la MEC, la inflamación, disfunción endotelial. Todo lo cual contribuye al aumento del tono vascular y caracteriza el fenotipo vascular en la hipertensión (Paravicini y Touyz, 2006).

1.5. Remodelado vascular en DOCA-OVX y efectos de la apocinina.

En 1992 el grupo de Shiffrin demostró que las arterias de ratas hipertensas DOCA-sal presentaban una reducción en el diámetro externo junto a una disminución del diámetro de la luz y un incremento del grosor de la capa media y

del área de la sección transversal (Li Yuan y Schiffrin, 1992). Posteriormente Karam y colaboradores (Karam et al., 1996) observaron que las animales hipertensos DOCA-sal mostraban una marcada hipertrofia cardíaca y fibrosis perivascular e intersticial.

En nuestro trabajo hemos demostrado como la privación de estrógenos provocada por la ovariectomía en el modelo de hipertensión DOCA aumenta el remodelado vascular preexistente que se acompaña con un incremento de la PAS. Este aumento en el remodelado se corrige por la reposición de estrógenos y por la inhibición de la NADPH oxidasa con la administración de apocinina. Hasta donde conocemos este es el primer trabajo que demuestra que en el modelo de hipertensión DOCA la privación de estrógenos aumenta el remodelado vascular preexistente y que ello se acompaña de un incremento de la PAS. Este mayor remodelado se corrige por la reposición de estrógenos y por la inhibición de la actividad NADPH oxidasa por la administración de apocinina.

Para realizar este estudio analizamos los vasos según el tamaño. Para vasos con un diámetro comprendido entre 50 y 100 μm no se obtuvieron diferencias significativas en el área de la pared entre animales DOCA, DOCA-OVX y DOCA-OVX tratados con apocinina. Sin embargo, la relación pared/luz aumentó significativamente en el grupo DOCA por efecto de la ovariectomía. Los animales DOCA-OVX tratados con apocinina muestran una disminución en la relación pared/luz alcanzando esta los valores del grupo DOCA.

En los vasos con diámetro externo comprendido entre 100 y 200 μm observamos que la privación de estrógenos produce un aumento significativo en el área de la pared del grupo ovariectomizado indicándonos que se ha producido un remodelado hipertrófico dado además que también la relación pared/luz está aumentada. Ambos parámetros revertían con el tratamiento con apocinina.

Además, para demostrar que estos cambios eran debidos a la disminución de estrógenos, los animales DOCA-OVX fueron tratados con 17β -estradiol obteniéndose una disminución de la relación pared/luz en vasos de 50 a 100 μm y vasos de 100 a 200 μm .

Los posibles mecanismos que pueden estar implicados en el remodelado vascular son:

- En la hipertensión DOCA-sal se produce un aumento significativo de la ET-1 y esta produce directamente remodelado cardíaco y vascular.

- La ET-1 produce un aumento de ROS a través del aumento de la actividad NADPH-oxidasa (Beswick et al., 2001).

- La ausencia de estrógenos tiene varios mecanismos para producir un aumento del remodelado:

a) La ovariectomía al incrementar las alteraciones vasculares que ya existen en las ratas DOCA justifica el aumento de PAS y el tratamiento con estrógenos, que produce una reversión del remodelado, explica la disminución de los cambios de presión encontrados en el grupo tratado.

b) La deprivación estrogénica aumenta los niveles de ET-1 como consecuencia de aumentos en su producción, en la actividad de la enzima convertidora de endotelina (ECE) o porque disminuye su degradación. Este aumento de la ET-1 por los mecanismos antes citados podría explicar el mayor remodelado. Además, la ovariectomía incrementa la expresión de RNAm de preproET-1 y la actividad de la ECE y los estrógenos revierten estos cambios (Wang et al., 2003). Otros estudios han mostrado que los estrógenos pueden acelerar la degradación del RNAm de ET-1 (Morey et al., 1998).

c) Sin embargo, el dato más interesante de nuestro estudio es que la ovariectomía produce un incremento de estrés oxidativo en el modelo de hipertensión DOCA-sal. Ello viene a completar estudios de nuestro grupo en los que habíamos demostrado que la ausencia de estrógenos en animales SD aumenta el estrés oxidativo y las resistencias vasculares (Hernández et al, 2000). Además, de acuerdo con los resultados del actual trabajo, la mayor producción de ROS estaría mediada por la ausencia de estrógenos. El aumento de ROS determinarían tanto los cambios de PAS como del remodelado, ya que el tratamiento con apocinina revierte ambos cambios.

1.6. Fibrosis perivascular en DOCA-OVX y efectos de la apocinina

Como ya comentamos en la introducción, la fibrosis se produce por un exceso en la acumulación de fibras de colágeno. Este exceso de fibras de colágeno es el resultado de dos mecanismos principales: un aumento en la producción de colágeno por los fibroblastos o una disminución de su degradación por las metaloproteinasas (MMPs) de forma directa o por una mayor actividad del inhibidor tisular de la MMPs (ITMP) (Weber et al. 2000).

La aparición de la fibrosis en animales DOCA fue descrita por Schiffrin en 1992 (Schiffrin, 1992). En nuestro trabajo se describe por primera vez que la fibrosis intersticial, ya presente en el modelo de hipertensión DOCA, aumenta por la ovariectomía. Además, ésta revierte cuando los animales son tratados con 17 β -estradiol o con apocinina, sugiriendo que la falta de estrógenos, a través de un aumento del estrés oxidativo, es la principal responsable de la acumulación del colágeno a nivel perivascular.

Los posibles mecanismos implicados en este proceso pueden ser:

- En este modelo de hipertensión se produce un aumento significativo de ET-1. En los trabajos realizados por Ammarguella (Ammarguella et al., 2001 y 2002) se demuestra que en la hipertensión DOCA-sal se produce un aumento significativo de ET-1 que produce directamente fibrosis cardíaca y vascular aumentando la expresión del RNAm del procolágeno I y III. Además el uso de antagonistas de los receptores ET_A previno la deposición de colágeno en estos animales.

- La ET-1 produce un aumento de ROS a través del aumento de la actividad NADPH-oxidasa (Beswick et al., 2001). Esta afirmación concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que el uso de apocinina disminuyó significativamente la fibrosis perivascular presente en los animales ovariectomizados.

- La ausencia de estrógenos por la ovariectomía tiene varios mecanismos para producir un aumento de la fibrosis:

a) La ovariectomía y por tanto la privación estrogénica puede por sí misma incrementar las alteraciones perivasculares que ya existen en las ratas DOCA, ya que el tratamiento con estrógenos, en nuestros animales, produce la reversión de la fibrosis.

b) La ovariectomía aumenta los niveles de ET-1 y ésta por los mecanismos antes citados puede producir mayor grado de fibrosis. En los trabajos realizados por el grupo de Wang (Wang et al., 2003) la ovariectomía aumentó la expresión de RNAm de preproET-1 y la actividad de la ECE y el tratamiento con 17 β -estradiol revirtió estos cambios.

c) La ovariectomía puede aumentar la producción de ROS, bien por un efecto directo en la producción de ROS o porque incrementa los niveles plasmáticos de ET-1 tal y como hemos discutido anteriormente.

2. MODELO DE HIPERTENSIÓN SHR

Nuestro grupo lleva años interesado en la relación que existe entre hipertensión y privación estrogénica y entre estas y el estrés oxidativo. Se han publicado diversos trabajos en los que se demuestra que la ovariectomía en animales control incrementa la PAS y los marcadores de las ROS (Hernández et al. 2000). Además, en el modelo SHR la ovariectomía produce remodelado vascular y aumentos de la PAS que se corrigen con el tratamiento estrogénico o con una combinación de 17 β -estradiol e IECAS (García et al. 2005 y 2006). Más recientemente se han estudiado los beneficiosos efectos del 2-metoxiestradiol sobre el remodelado y la PAS secundarios a la falta de estrógenos y se ha demostrado que parte de este efecto pueda ser debida a la mayor liberación de NO (Bonacasa et al. 2008) (Fenoy et al. 2010). Parecía lógico que en este trabajo nos planteáramos qué efecto tenía la inhibición de la producción de ROS sobre el remodelado vascular y los cambios en la PAS provocados en el modelo SHR por la ausencia de estrógenos.

2.1. Efecto de la ovariectomía sobre la presión arterial.

En los resultados de nuestro trabajo hemos obtenido un aumento significativo de la PAS en ratas SHR ovariectomizadas sobre los valores de las SHR intactas. Existen datos conflictivos sobre los efectos que la gonadectomía tienen en la PAS en SHR, pero nuestros resultados y los anteriormente publicados (García et al., 2005) señalan que en las SHR-OVX la PAS aumenta sobre los niveles de las SHR. Este incremento de PAS es debido a la falta de estrógenos, dado que nuestro grupo ha demostrado que este cambio en la presión se revierte con el uso del 17β -estradiol (García et al., 2005). Además cuando tratamos a nuestros animales ovariectomizados con apocinina se obtuvo un descenso de la PAS que alcanzó valores similares a las de los animales SHR. Todo lo cual nos indica que en estos animales la ausencia de estrógenos produjo un aumento del estrés oxidativo que fue en parte responsable del incremento de presión arterial. Esta aportación es la más interesante de nuestro trabajo ya que una amplia búsqueda bibliográfica evidencia que este es un dato desconocido y no publicado previamente.

2.2. Aumento del estrés oxidativo en SHR y SHR-OVX

En 1995 (Grunfeld et al., 1995) se demostró que en el modelo de hipertensión SHR existe una exagerada producción de radical superóxido. Este aumento de superóxido daba lugar a una disminución de la disponibilidad de NO formando peroxinitrito y contribuyendo así a la elevación de la presión arterial.

Una vez confirmada la elevada producción de superóxido había que establecer los mecanismos por los cuales se producía. En el trabajo realizado por Zalba y colaboradores (Zalba et al., 2000) demostraron que la actividad NADPH oxidasa estaba aumentada en SHR con respecto a los animales normotensos y que este aumento de la actividad estaba asociado con un aumento de la expresión del RNAm de la p22phox. Estos resultados sugieren que la exposición a la hipertensión en combinación con otros factores como la sobreproducción de Ang II podría jugar un importante papel en el aumento de la expresión de p22phox y de la actividad de la NADPH oxidasa. El mecanismo que podría explicar el aumento directo de la actividad de la NADPH oxidasa en SHR también ha sido discutido. Aunque algunos autores como Zalba (Zalba et al., 2000) han propuesto que es el propio aumento de

presión el responsable, otros proponen que sería la Ang II anormalmente elevada en este modelo la causante de este efecto, ya que la infusión de Ang II en ratas produce un aumento de la expresión de p22phox. Este mecanismo posible se asemejaría a lo que en las DOCA con respecto a la ET-1.

Además el tratamiento con apocinina disminuye la PAS en SHR y esta disminución se acompañó de un descenso en la expresión de la proteína NF- κ B. El tratamiento con apocinina también disminuyó la expresión de las subunidades p67phox y p22phox de la NADPH oxidasa asociado con un descenso de la concentración de GMPc (Pechanova et al., 2009).

En el caso del modelo de hipertensión SHR, como en el caso del modelo de hipertensión DOCA que ya hemos comentado en el apartado anterior, los estrógenos por si mismos inhiben la formación de especies reactivas del oxígeno. En trabajos realizados por nuestro grupo se demostró que la deficiencia estrogénica está asociada a un aumento del estrés oxidativo y a un descenso en la producción de NO y que la reposición de estrógenos como el 17 β -estradiol y el 2-metoxiestradiol previnieron esta situación (Hernández et al., 2000; Bonacasa et al., 2008; (Fenoy et al. 2010). Además en los resultados que aquí se presentan demostramos, medida por quimioluminiscencia, un aumento significativo en la actividad NADPH oxidasa en animales SHR-OVX con respecto a los SHR.

Los mecanismos por los que la gonadectomía aumenta el estrés oxidativo en SHR son complejos. Al igual que ocurre con la ET-1 en el modelo DOCA que antes discutimos, los estrógenos tienen en SHR un efecto inhibitorio sobre el sistema renina-angiotensina a través del descenso de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Por el contrario la deficiencia estrogénica aumenta la actividad del sistema renina y angiotensina y la expresión de la densidad de los receptores AT-1, que da lugar a un incremento de la actividad de la ECA y por tanto puede contribuir al aumento de presión arterial (Hinojosa-Laborde et al., 2004). Además, otros mecanismos pueden contribuir a que la deprivación de estrógenos incremente la producción de ROS: se ha sugerido que la ovariectomía disminuye los niveles de los enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx (Ha, 2004)

2.3. Remodelado vascular en SHR-OVX y efecto de la apocinina

En relación a los resultados sobre el remodelado vascular que aquí presentamos demostramos que existe un aumento significativo en el área de la pared y en la relación pared/luz en los animales SHR ovariectomizados con respecto a los SHR con diferencias significativas en los dos parámetros medidos en arteriolas miocárdicas de tamaños comprendidos entre 50 y 100 μm y en los vasos con un diámetro comprendido entre 100 y 200 μm . Este aumento del remodelado es de tipo hipertrófico ya que para todos los niveles de diámetro estudiados se produce un incremento en el área de la pared. Aunque parte de estos resultados ya habían sido presentados por nuestro grupo (García et al. 2005 y 2006), los datos de mayor interés se refieren a los efectos que tiene la apocinina sobre este remodelado. De hecho, y hasta donde conocemos, nuestra aportación demostrando que apocinina revierte los cambios vasculares producidos por la ovariectomía en SHR es original. Datos muy recientes en la literatura analizan el papel que la inhibición de la NADPH oxidasa tiene en arterias aisladas indicando que el remodelado producido por la infusión crónica de A II se previene con el tratamiento con apocinina (Martinez-Lemus et al. 2011). Por otro lado, Castro y colaboradores en 2009 demostraron que el tratamiento con un inhibidor de NADPH oxidasa reduce los cambios vasculares producidos en un modelo de hipertensión dependiente de Ang II (al igual que en las SHR) como es el 2K-1C.

La fibrosis perivascular también aumentó en los animales SHR-OVX con respecto a las SHR intactas. Estos resultados son semejantes a los obtenidos anteriormente por nuestro grupo en los que la ovariectomía en ratas SHR de 18 semanas aumenta la fibrosis en arteriolas miocárdicas. Todos los cambios vasculares descritos revirtieron con la reposición de 17β -estradiol (García et al., 2005). Por otro lado, parece evidente que la deprivación estrogénica, que en los presentes resultados aumenta la fibrosis miocárdica, podría mediar este efecto a través de un aumento en la producción de ROS. En efecto el tratamiento con apocinina reduce la fibrosis hasta reducirla al nivel de los animales no ovariectomizados, ello posiblemente esté mediado por las acciones que los ROS ejercen aumentando la actividad de diversas metaloproteinasas (Castro et al. 2009).

VII. CONCLUSIONES

RESUMEN DE RESULTADOS

- Modelo de hipertensión DOCA-sal

- 1- En el modelo DOCA, la privación estrógena produce aumentos en el peso corporal de los animales ovariectomizados.
- 2- La ovariectomía provoca un mayor incremento de presión arterial sistólica en los animales con hipertensión DOCA que se previene con la administración de 17β -estradiol.
- 3- La ovariectomía produce un mayor incremento del estrés oxidativo que el observado en el modelo de hipertensión DOCA.
- 4- La inhibición de la actividad de NADPH oxidasa con apocinina disminuye la presión arterial en el modelo DOCA ovariectomizado.
- 5- La privación estrogénica empeora el remodelado vascular existente en el modelo de hipertensión DOCA y la reposición de estrógenos previene este efecto.
- 6- La administración de apocinina reduce el remodelado vascular presente en los animales DOCA ovariectomizados por disminución del estrés oxidativo.
- 7- La ovariectomía produce un aumento de la fibrosis perivascular observada en el modelo de hipertensión DOCA que se previene con el tratamiento con 17β -estradiol.
- 8- La administración de apocinina disminuye los niveles de fibrosis perivascular en los animales DOCA ovariectomizados por disminución del estrés oxidativo.

- Modelo de hipertensión SHR

- 1- El tratamiento con apocinina previene el mayor incremento de la presión arterial sistólica presente en el modelo de hipertensión SHR ovariectomizadas.
- 2- El tratamiento con apocinina previene el incremento del remodelado vascular presente en los animales SHR ovariectomizados.
- 3- El tratamiento con apocinina disminuye la fibrosis perivascular causada por la deprivación estrógenica en el grupo SHR.

CONCLUSIONES

1.- La deprivación de estrógenos produce un aumento del estrés oxidativo en un modelo experimental de hipertensión semejante a la hipertensión secundaria humana.

2.- En este modelo, el aumento del estrés oxidativo determina un aumento del remodelado vascular hipertrófico asociado a un aumento de la presión arterial sistólica.

3.- La deprivación de estrógenos produce un aumento del estrés oxidativo, en un modelo de hipertensión experimental semejante a la hipertensión esencial humana.

4.- En este modelo, el aumento del estrés oxidativo determina un aumento del remodelado vascular hipertrófico asociado a un aumento de la presión arterial sistólica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

Akarasereenont P, Techatraisak K, Thaworn A, Chotewuttakorn S. The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. *Inflammation Research* 49: 460-465, 2000.

Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25: 155-161, 1995.

Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25:155-161, 1995.

Ammarguella FZ, Gannon PO, Amiri F, Schiffrin EL. Fibrosis, matrix metalloproteinases and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ETA receptors. *Hypertension* 39 (II): 679-684, 2002.

Ammarguella FZ, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effects of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation* 103(2): 319-324, 2001

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291: 1701-1712, 2004

Arai T, Kelly SA, Brengman ML, Takano M, Smith EH, Goldschmidt-Clermont PJ, Bulkley GB. Ambient but not incremental oxidant generation effects intercellular adhesion molecule 1 induction by tumor necrosis factor alpha in endothelium. *Biochemical Journal* 331:853-61, 1998.

Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous CCK satiating action in ovariectomized rats. *Peptides* 20; 445-50, 1999.

B

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397:342-4, 2002.

Barbacanne MA, Rami J, Michel JB, Souchart JP, Philippe M, Besombes JP, Bayard F, Arnal JF. Estradiol increases rat aorta endothelium-derived relaxing factor (EDRF) activity without changes in endothelial NO synthase gene expression: possible role of decreased endothelium-derived superoxide anion production. *Cardiovascular Research*, 41: 672-681, 1999.

Barrios G, León JG, Rodríguez F, De los Rios M, Del Portillo HC. La íntima I. *Revista Colombiana de Cardiología* 9(3):264-275, 2001.

Barrios G, León JG, Rodríguez F, De los Rios M, Del Portillo HC. La íntima II. *Revista Colombiana de Cardiología* 9(4):324-334, 2002a.

Barrios G, León JG, Rodríguez F, De los Rios M, Del Portillo HC. La íntima III. *Revista Colombiana de Cardiología* 10(2):73-90, 2002b.

Barton M, Meyer MR, Haas E. Hormone replacement therapy and atherosclerosis in postmenopausal women: does aging limit therapeutic benefits? *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 27: 1669-1672, 2007.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 38: 1107-1111, 2001.

Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore. *Trends in Biochemical Sciences* 28:502-2, 2003.

Bonacasa B, Sanchez ML, Rodriguez F, Lopez B, Quesada T, Fenoy FJ and Hernández I. 2-Methoxyestradiol attenuates hypertension and coronary vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Maturitas*, 61: 310-316, 2008.

Brandes RP, Viedt C, Nguyen K, Beer S, Kreuzer J, Busse R, Gollach A. Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phx-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thrombosis and Haemostasis* 85:1104-10, 2001.

Butera PC. Estradiol and control of food intake. *Physiol Behav*, 99: 175-180, 2010.

C

Cai H, Griendling KK, Harrison OG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends in Pharmacological Sciences.* 24: 471-8, 2003.

Callera GE, Tostes RC, Yogi A, Montezano A, Touyz RM. Endothelin-1 induced oxidative stress in DOCA-salt hypertension involves NADPH-oxidase-independent mechanisms. *Clinical Science* 110: 243-253, 2006.

Castelao JE, Gago-Dominguez M. Risk factors for cardiovascular disease in women: Relationship to lipid peroxidation and oxidative stress. *Med. Hypothesis* 71, 39-44, 2008

Castro MM, E Rizzi, GJ Rodriguez, CS Ceron, LM Bendhack, RF Gerlach, JE Tanus-Santos, Antioxidant treatment reduce matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med.* 46(9): 1298-1307, 2009

Caulin Glaser T, García-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circulation Research* 81: 885-892, 1997.

Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of Clinical Investigation* 98: 36-42, 1996.

Ceriello A, Guigliano A, Dello Russo P and Lefebvre PJ. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetes Med* 8:540-542, 1991.

Ceriello A, Guigliano A, Dello Russo P and Lefebvre PJ. Metabolic control may influence the increased superoxide generation in diabetic serum. *Diabetes Med* 8:540-542, 1991.

Chakrabarti S, Lekontseva O, Davidge ST. Estrogen is a modulator of vascular inflammation. *IUBMB Life*, 60(6): 376-382, 2008.

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z. Estrogen receptor alfa mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103: 401-6, 1999.

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *Journal of Clinical Investigation* 103:401-406, 1999.

Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS, Hoffman GS. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1 and vascular cell adhesion molecule type 1. *Journal of clinical investigation* 93: 17-25, 1994.

Crofton JT, Share L, Brooks DP. Gonadectomy abolishes the sexual dimorphism in DOCA-salt hypertension in the rat. *Clin Exp Hypertens*. 17: 1249-1261, 1989.

Crofton JT, Share L. Gonadal hormones modulate deoxycorticosterone-salt hypertension in male and female rats. *Hypertension*, 29 (part 2): 494-499, 1997.

Csányi, G, Taylor, R and Pagano, PJ, NOX and inflammation in the vascular adventitia. *J, Free Radic. Biol. Med.* 47: 1254-1256, 2009.

D

Dalvit-McPhillips SP. The effect of human menstrual cycle on nutrient intake. *Physiol Behav* 31(2): 209-212.1983.

De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armeinto A, Ferri C and Balsano F. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47:993-997, 1998.

Dosquet C, Weill D and Wautier JL. Molecular mechanism of blood monocyte adhesion to vascular endothelial cells. *Nouv Rev Fr Hematol* 34 Suppl: S55-S59, 1992.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82:47-95, 2002.

Dubey RK, Jackson EK, Imthun B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptorindependent mechanism. *Hypertension* 37 (Part 2): 640-644, 2001.

Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin I receptors. *Journal of clinical investigation* 96:141-9, 1995.

Dubey RK, Oparil S, Imthum B, Jackson EK. Sex hormones and hypertension. *Cardiovascular Research* 53: 688-708, 2002.

Dubey RK. Vasodilatador derived nitric oxide inhibits fetal calf serum and angiotensin II-induced growth of renal arteriolar smooth muscle cells. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapy* 269:402-8, 1994.

F

Farhat MY, Lavigne MC and Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB. J* 10:615-624. 1996

Fenoy FJ, Hernández ME, Hernández M, Quesada T, Salom MG, Hernández I. Acute effects of 2-methoxyestradiol on endothelial aortic NO release in male and ovariectomized female rats. *Nitric Oxide* 23(1): 12-19, 2010.

Filardo, E. J. and Thomas, P. (2005) GPR30: a seven-transmembranespanning Flavia D, Carvalho Mh, Cobra A, Nigro D, Fortes Z, Reboucas NA and Tostes R. Ovarian hormones modulate endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* 38: 692-696, 2001.

Forstermann U, Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease, *Pflugers Arch.* 459(6):923-39. 2010.

Fortepiani LA, Zhang H, Racusen L, Roberts LJ, Reckelhoff JF. A characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, 41: 640-645, 2003

Fortuño A, San Jose G, Moreno MU, Díez J and Zalba G. Oxidative stress and vascular remodeling. *Exp Physiol* 90(4):457-462, 2005.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980.

G

Gadner JD, Murray DB, Voloshenyuk TG, Broger GI, Bradley JM, Janicki JS. Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *Am J Physiol* 298(2): H497-504, 2010.

Galisteo M, Gracia-Saura MF, Jiménez R, Villar IC, Zarzuelo A, Vargas F y Duarte J, Effects of quercetin treatment on antioxidant defense system, *Mol Cell Bioch.* 259; 91-99, 2004

García MP, Giménez J, Bonacasa B, Carbonell LF, Salom M, Quesada T, Hernández I. 17 β -estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in SHR. *Menopause* 12:453-459, 2005.

Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL. Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *Journal Biological Chemistry* 278:2006-12, 2003.

Gerhard M and Ganz P. How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. *Circulation* 92: 5-8, 1995.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal F, Summerville W. Studies on experimental hypertension. I The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59: 347-352, 1934.

Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N, HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*, 288: 49-57, 2002.

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

Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 133: 933-941, 2000.

Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain W, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 26: 854-857, 1995.

Guyton AC, Coleman TG, Fourcade JC, Navar LG. Physiologic control of arterial pressure. *Bull N Y Acad Med.* 45(9): 811-30, 1969.

H

Haddock BL, Marshak HP, Mason JJ, Blix G. The effects of hormone replacement therapy and exercise on cardiovascular disease risk factors in post-menopausal women. *Sports Med* 29:39-49, 2000.

Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine.* Oxford, UK: Clarendon, 1989.

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

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol* 11: 298-300, 1956.

Harrington WR, Sheng S, Barnett DH, Petz LN, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Activities of estrogen receptor alpha and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression. *Mol Cell Endocrinol*, 206: 13-22, 2003.

Hayashi T, Fukuyo JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proceedings on the National Academy of Sciences, USA*, 89: 11259-11263, 1992.

HB Ha, Oxidative stress in ovariectomy menopause and role of chondroitin sulfate, Arch Pharm Res. 27(8): 867-872, 2004.

Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N and Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual Processes of remodeling and growth. Hypertension 21: 391-397, 1993.

Hernández I, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, Teruel MJ, Llanos MC and Carbonell LF. 17 beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. Am.J. Physiol Regul Integra Comp Physiol 279:R1599-R1605, 2000.

Hinojosa-Laborde C, Craig T, Zheng W, Ji H, Haywood JR, Sandberg K. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. Hypertension 44: 405-409, 2004.

Hsia J, Langer RD, Manson JE, Kuller L, Johnson KC, Hendrix SL, Pettinger M, Heckbert SR, Greep N, Crawford S, Eaton CB, Kostis JB, Caralis P, Prentice R. Women's Health Initiative Investigators. Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. Arch Intern Med 166: 357-365, 2006.

I

Ignarro LJ and Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. Ann Pharmacol Toxicol 25:171-191, 1985.

Intengan HD. Vascular remodeling in hypertension: role of apoptosis, inflammation and fibrosis. Hypertension 38: 581-587, 2001.

Intengan HD and Schiffrin EL (Intengan HD and Schiffrin EL, Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension, Hypertension 36: 312-318, 2000.

Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension. Roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. Hypertension 38(2):581-87, 2000.

Isabel H, Delgado JL, Díaz J, Quesada T, García MP, Llanos MC, Carbonell LF. 17 β -estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 279: R1599-R1605, 2000.

Isles CG, Hole DJ, Hawthorne VM and Lever AF. Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men. Lancet 339:702-706, 1992

K

Kahonen M, Tolvanen JP, Sallinen K, Wu X, Porti I. Influence of gender on control of arterial tone in experimental hypertension. Am J Physiol Heart Cir Physiol 275: H15-H22, 1998.

Kannel WB, Wilson PW. Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med*, 155: 57-61, 1995.

Karam H, Heudes D, Hess P, Gonzalez MF, Löfler BM, Clozel M, Clozel JP. Respective role of humoral factors and blood pressure in cardiac remodeling of DOCA hypertensive rats. *Cardiovascular research*, 31: 287-295, 1996.

Kausar K, Rubenyi GM. Gender difference in bioassayable endothelium-derived nitric oxide from isolated rat aortae. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H2311-H2317, 1994.

Keyse SM and Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:99-103, 1989.

Kimura M, Irahara I, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Ymano S, Kamada M, Aono T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1349-1353, 2002.

Kochx MM, De Meyer GR, Jacob WA, Bult H, Herman AG. Triphasic sequence of neointimal formation in the cuffed carotid artery of the rabbit. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 12(12):1447-57, 1992.

Koh KK, Son JW, Ahn JY, Lee SK, Hwang HY, Kim DS, Jin DK, Ahn TH, Shin EK. Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. *International Journal of Cardiology*, 81: 43-50, 2001.

Kojsova S, Jendekova L, Zicha J, Kunes J, Andriansitohaina R, Pechanova O. The effect of different antioxidants on nitric oxide production in hypertensive rats. *Physiol Res*, 55: S3-S16, 2006

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660, 1999.

L

Langston JB, Guyton AC, Douglas BH, Dorsett PE. Effect of changes of salt intake on arterial pressure and renal function. *Circ Res* 12: 508-514, 1963.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R277-R297, 2003.

Leusen JH, Verhoeven AJ, Ross D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: intrigues in the phox family. *J Lab Clin Med*. 128(5): 416-76, 1996.

Li Yuan D, Schiffrin EL. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol*, 31: H1782-H1787, 1992.

Lopes RL, Dagher MC, Gutierrez A, Young B, Bouin AP, Fuchs A, Babior BM. Phosphorylated p40phox as a negative regulator of NADPH oxidase. *Biochemistry* 43:3723-3730, 2004.

M

Mackman N, Smyth S. Cardiovascular disease in women. *Arterioscler Thromb Vas Biol*, 29(3): 277-8, 2009.

Manning RD, Tian N, Meng S. Oxidative stress and antioxidant treatment in hypertension and the associated renal damage. *Am J Nephrol*, 25: 311-317, 2005.

Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse JR, Stein E, Cushman M. Women's Health Initiative Investigators Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med*, 349: 523-534, 2003.

Martinez-Lemus LA, Zhao G, Galiñanes EL y Boone M, Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(6): H2002-H2015, 2011.

Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, Kuro T, Kitano K, Ohkita M, Opgenorth TJ, Takaoka M. Different contributions of endothelin- A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate salt induced hypertension in rats. *Hypertension* 33: 759-765, 1999.

McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.

McGiff JC, Quilley CP. The rat with spontaneous genetic hypertension is not a suitable model of human hypertension. *Cir. Res*, 48(4): 455-463, 1981.

Meyer RM, Prossnitz ER and Barton M, The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as regulator of cardiovascular function, *Vasc. Pharmacol.* 308: 17-25, 2011.

Migliaccio A, Domenico M, Di Castoria G et al. Tyrosine kinase/p21 ras/ Map-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*, 15: 1292-996, 1996.

Milewicz A, Tworowska V, Demissie M. Menopausal obesity-myth or fact?. *Climacteric* 4: 273-83, 2001.

Miller AP, Chen YF, Xing D, Feng S, Oparil S. Hormone replacement therapy and inflammation: Interaction in cardiovascular disease. *Hypertension*, 42: 657-663, 2003.

Miller VM, Clarkson TB, Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR, Naftolin F, Santoro N. Women, hormones, and clinical trials: a beginning, not an end. *J Appl Physiol*, 99:381-383, 2005.

Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev*, 60: 210-241, 2008.

Mittal CK and Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 4360-4364, 1977.

Morey AK, Razandi M, Pedram A, Hui RM, Prins BA, Levin ER. Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochemical Journal* 330 (Part 3): 1097-1105, 1998.

Mulvany MJ, Hansen OK, Aalkjae C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in SHR is associated with a narrowed lumen and a thickened media. *Cir Res*, 43: 854-864, 1978

Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vandevan G, rabhu V, Subramaniam V, Jagadeesan A, Narasimhan S. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta* 360: 81-6, 2005.

N

Nabeebaccus A, Zhang M and Shah AM, NADPH oxidase and cardiac remodeling, *Heart Fail Rev*, 16: 5-12, 2011.

Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Baumer AT, Albory K, Sauer H, Bohm M. Differential effects of estrogen and progesterone on AT1 receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102: 1828-1833, 2000.

Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R, Carvalho MHC. Simultaneous release of endothelium-derived relaxing and contracting factors induced by noradrenaline in normotensive rats. *General Pharmacology*, 21: 443-446, 1990.

O

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap Cir J*, 27: 282-293, 1963.

Orshal JM, Raouf AK. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Comp Physiol* 286: R233-R249, 2004.

Ortiz PA, Garvin JL. Intrarenal transport and vasoactive substances in hypertension. *Hypertension* 38(2):621-624, 2001.

Ospina JA, Krause DN, Duckles SP. 17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase. *Stroke*, 33: 600-605, 2002.

Ouchi Y, Share L, Crofton JT, Iitake K, Brooks DP. Sex differences in the development of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 9: 172-177, 1987.

Ouyang P, Michos ED, Karas RH. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system. *J amer Coll Cardiol*, 47: 1741-1753, 2006.

P

Pantel K, Schlimok G, Angstwurm M, Passlick B, Izbicki JR, Johnson JP and Riethmuller G. Early metastasis of human solid tumors: expression of cell adhesion molecules. *Ciba Found Symp* 189: 157-170, 1995.

Paravicini TM and Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 (Suppl. 2): S170-S180, 2008.

Paravicini TM and Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovascular Research* 71:247-258, 2006.

Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, Barry-Lane P, Hu Z, Horaist C et al. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin: evidence that p47phox may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *Journal Biological Chemistry*. 274:19814-22, 1999

Pavón de Paz I, Alameda C, Olivar J. Obesidad y menopausia. *Nutr. Hosp* 21(6): 633-637, 2006.

Pechanova O, Jendekova L, Vrankova S. Effect of chronic apocynin treatment on nitric oxide and reactive oxygen species production in borderline and spontaneously hypertension. *Pharma Reports*, 61:116-122, 2009.

Phillips LS, Langer RD. Postmenopausal hormone therapy: critical reappraisal and a unified hypothesis. *Fertil Steril*, 83: 558-566, 2005.

R

Radomski MW, Palmer RMJ, and Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-646, 1987.

Raghvendra KD, Edwin KJ. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F365-F388, 2001.

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG and Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 11:2572-2579, 1996.

Rey F and Pagano PJ. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 22:1962-1971, 2002.

Ritterband AB, Jaffe IA, Densen PM, Magagna JF, Reed E. Gonadal function and the development of coronary heart disease. *Circulation* ,27:237-51. 1963.

Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34:943-9, 1999.

Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*, 297: 1465-1477, 2007.

Roth S and Dröge W. Regulation of T cell activation and T cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell Immunol* 108: 417-424, 1987.

Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K et al. Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta: gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* 99: 2429-37, 1997.

Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Nat Acad Sci USA*, 97: 5930-5935, 2000.

S

Sakuma I, Liu MY, Sato A, Hayashi T, Iguchi A, Kitabatake A, Hattori Y. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *British Journal of Pharmacology*, 135: 48-54, 2002.

Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension, *Vasc Pharmac* 43; 19-29, 2005.

Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. *Hypertension*, 19 (II): 1-9, 1992.

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

Schreck R and Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NK- κ B transcription factor and HIV-1. *Trends Cell Biol* 1:39-42, 1991.

Schulz E, Gori T y Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension, *Hypertens Res* 34(6):665-673, 2011.

Shenoy V, Grobe JL, Qi Y, Ferreira AJ, Fraga-silva RA, Collamat G, Bruce E and Katovich MJ. 17- β estradiol modulate cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides* 39; 2309-2315, 2007.

Sherwood A, Bower JK, McFretidge-Durdle J, Blumenthal JA, Newby LK, Hinderliter AL. Age moderates the short-term effects of transdermal 17 β -estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27: 1782-1787, 2001.

Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 27:199-204, 2009.

Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219, 1993.

Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Di PL, Costa MP, Pennisi G, Ierna D and Caschetto S. Duration of menopause and behavior of malondialdehyde, lipids, lipoproteins and carotid wall artery intima-media thickness. *Maturitas* 39:39-42, 2001.

Sirker A, Zhang M, Murdoch C and Shah AM. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodeling and heart failure. *Am J Nephrol* 27:649-660, 2007.

Sommers MJ, Harrison DG. Reactive oxygen species and the control of vasomotor tone. *Curr Hypertens Rep*, 1: 102-108, 1999.

Sommers MK, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Hypertension*, 101: 1722-1728, 2000.

Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62: 792-821, 1993.

Staessen J, Fagard R, Lijnen P, Amery A. The influence of menopause on blood pressure. *International forum for the evaluation of cardiovascular care*, libro abstracts: 54, 1994.

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijman JH, Verhoeven AJ: Characteristic of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substitute catechol. *Amer J Respir Mol Biol* 11: 95-102, 1994

Stork, S., van der Schouw, Y. T., Grobbee, D. E., and Bots, M. L. Estrogen, inflammation and cardiovascular risk in women: a critical appraisal. *Trends Endocrinol Metab*, 15: 66-72, 2004.

Storz G, Tartaglia LA and Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248: 189-194, 1990.

Sugamura K and Keaney J, Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* 51: 978-992, 2011.

Sullivan JC, Pardieck JL, Brison K y Kang KT, Effects of estradiol on renal cyclic guanosine monophosphate and oxidative stress in SHR, *Gend Med*, 6(3); 498-510, 2009.

T

Thiery J, Teupser D, Walli AK, Ivandic B, Nebendahl K, Stein O, Stein Y and Seidel D. Study of causes underlying the low atherosclerotic response to dietary hypercholesterolemia in a selected strain of rabbits. *Atherosclerosis* 121:63-73, 1996.

Thiery J, Teupser D, Walli AK, Ivandic B, Nebendahl K, Stein Y and Seidel D. Study of causes underlying the low atherosclerotic response to dietary hypercholesterolemia in a selected strain of rabbits. *Atherosclerosis* 121: 63-73, 1996.

Tommaselli GA, Di Carlo C, Pellicano M, Nasti A, Ferrara C, Di Spiezio Sardo A and cols. Modificaciones de los niveles séricos de leptina en menopausa. *Minerva Ginecol* 53:193-8, 2001.

Török J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol Res*, 37: 813-825, 2008.

Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MHC. Effects of estrogen on the vascular system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1143-1158, 2003.

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

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. Expression of a functionally active gp91 phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation Research*, 90:1205-13, 2002.

Touyz RM, Schiffrin EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34:976-982, 1999.

Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52:639-72, 2000.

Touyz RM, Yao G, Schiffrin EL. C-Ser induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:981-987, 2003.

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

V

Van Baal VM, Smolders RG, van der Mooren MJ, Teerlink T, Kenemans P. Hormone replacement therapy and plasma homocysteine levels. *Obstet Gynecol* 94: 485-91, 1999.

Varo N, Etxebarria N, Etxebarria JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, et al. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 17: 107-14, 1999.

Varo N, Iraburu MJ, Varela M, López B, Etxebarria JC, Díez J. Chronic AT(1) blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 1197-202, 2000.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 59(9): 1428-59, 2002.

Viles-González JF, Anand SX, Valdiviezo C, Zafar MU, Hutter R, Sanz J, Rius T, Poon M, Fuster V, Badimon JJ. Update in atherothrombotic disease. *Mount Sinai Journal of medicine* 71(3):197-208, 2004.

Virdis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, Buralli S, Taddei S, Salvetti A. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation*, 101: 2258-2263, 2000.

W

Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASED Journal*, 15: 2121-2130, 2001.

Wang TZ, Yang D, Fu X, Pan JY. Mechanisms of 17beta-estradiol on the production of ET-1 in the ovariectomized rats. *Life Sci*, 73(2): 2665-2674, 2003.

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

Weber KT, Sun Y, Dhalla AK, Guntaka RV. Extracellular matrix and fibrosis in cardiac hypertrophy. En: Sheridan DJ, editor. *Left ventricular hypertrophy*. London: Churchill Livingstone p.37-44, 1998.

Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Current opinions in cardiology* 15:264-72, 2000.

White RE, darkow DJ, Lang JL. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research*, 77: 936-942, 1995.

Wren BG, Routledge DA. Blood pressure changes. Estrogens in climacteric woman. *Med J Aust* 2: 528-31, 1981.

X

Xing D, Hage FG, Chen YF, McCrory MA, Feng W, Skibinski GA, Majid-Hassan E, Oparil S, Szalai AJ. Exaggerated neointima formation in human C-reactive protein transgenic mice is IGG Fc receptor type I (FcRI) dependent. *Am J Pathol*, 172: 22-30, 2008.

Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29:289-295, 2009.

Y

Yen CH, Hsieh CC, Chou SY, Lau YT. 17β-estradiol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *Life Sci*, 70(4): 403-413, 2001.

Z

Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuño A, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 35: 1055-1061, 2000.

Zhang L Fujii S, Kosaka H. Effects of estrogen on reactive oxygen species production in the aorta of ovariectomized Dhal SALT-sensitive rats. *Hypertension*, 25(2): 407-414, 2007.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the Mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432, 1994.